

**METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
VERBESSERUNG DER ZYTOSTATIKA-THERAPIE
VON TUMOREN DURCH SENSIBILITÄTS-
TESTUNG, BESTIMMUNG DER
ZELLZYKLUSPHASEN UND
PARTIALSYNCHRONISATION**

Kurt Possinger

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0099

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR VERBESSERUNG DER
ZYTOSTATIKA-THERAPIE VON TUMOREN DURCH SENSIBILI-
TÄTSTESTUNG, BESTIMMUNG DER ZELLZYKLUSPHASEN UND
PARTIALSYNCHRONISATION

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Kurt Possinger
aus Ingolstadt

München 1974



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. Hartmut Rabes
Korreferent: Prof. Dr. Max Eder
Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.2.1974

Herrn Prof. Dr. med. H. Rabes, meinem Doktorvater, danke ich für die Themenstellung und Einführung in die experimentelle Arbeitsweise. Den medizinisch technischen Assistentinnen Frl. R. Kerler, Frau E. Hajok und Frau N. Kirkpatrick danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit.

Die finanzielle Förderung der Arbeit erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Jugend, Familie und Gesundheit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Sensibilitätstestung von Tumoren	3
2.1. Einleitung	3
2.2. Material und Methode	8
2.2.1. Sensibilitätstestung des Zajdela-Ascites-Hepatoms gegenüber Actinomycin D	8
2.2.2. Vergleich der Empfindlichkeit von Ascites-Tumoren, soliden Geschwülsten und Trypsin-dispergierten soliden Tumoren gegenüber Actinomycin D und Vincristin	12
2.2.2.1. Ascites-Form (Yoshida-Ascites-Sarkom und Walker-Ascites-Carcinom)	12
2.2.2.2. Solide Tumoren (Yoshida-Sarkom, Walker Carcinom)	18
2.2.2.3. Trypsin-dispergierte Tumoren (Walker-Carcinom)	24
2.2.3. Sensibilitätstestung eines menschlichen Mamma-Carcinoms und eines Wilms-Tumors gegenüber Actinomycin D und Vincristin	29
2.3. Ergebnisse	31
2.4. Diskussion	40
2.5. Abbildungen	49

3.	Bestimmung der Dauer des Generations- zyklus und seiner Teilphasen bei Walker- Carcinomen	57
3.1.	Einleitung	57
3.2.	Material und Methode	60
3.2.1.	Bestimmung der Zellzykluszeiten durch die QUASTLER-SHERMAN-Methode	60
3.2.2.	Bestimmung der Zellzykluszeiten mittels Doppelmarkierung mit ^3H - und ^{14}C -Thymidin	63
3.3.	Ergebnisse und Diskussion	68
4.	Synchronisation von Walker-Carcinomen durch in vivo-Applikation von 5-Fluorouracil	93
4.1.	Einleitung	93
4.2.	Material und Methode	98
4.3.	Ergebnisse	101
4.4.	Diskussion	102
5.	Ausblick	105
6.	Zusammenfassung	108
7.	Literaturverzeichnis	111

1. EINLEITUNG

Die Vielfalt der heute verfügbaren, zytostatisch wirksamen Präparate stellt den Arzt immer wieder vor die Frage, welches Zytostatikum oder welche Zytostatikakombination er bei einem bestimmten Tumorpatienten anwenden soll. Häufig erfolgt die Tumorbehandlung nach empirisch gewonnenen Therapieschemen, die meist auf der Kombination mehrerer, biochemisch verschiedenartig wirkender Zytostatika beruhen, die wiederum entweder simultan oder in einer bestimmten zeitlichen Reihenfolge appliziert werden. Die Anwendung solcher Therapie-schemen bietet allerdings nur eine sehr allgemeine Richtschnur bei der Tumorbehandlung, vergleichbar dem "blinden" Einsatz von Antibiotika bei einer unbekannten bakteriellen Infektion. Ohne spezielle Voruntersuchungen läßt sich im individuellen Fall keine sichere Aussage über die Wirksamkeit eines bestimmten Präparates auf den vorliegenden Tumor treffen. Gelingt es allerdings, Tumorgewebe von Patienten zu erhalten, so kann eine wirkungsvolle, individuelle chemotherapeutische Behandlung durchgeführt werden: Durch prätherapeutische *in vitro*-Testung kann zunächst die Sensibilität der Tumorzellen

gegenüber verschiedenen Zytostatika ermittelt und die Anwendung unwirksamer Medikamente weitgehend vermieden werden. Durch Verabreichung eines phasenspezifisch wirksamen Zytostatikums kann dann eine partielle Synchronisation der Tumorzellen herbeigeführt und durch eine konsekutive Behandlung mit weiteren prätherapeutisch ausgetesteten, phasenspezifisch wirksamen Substanzen eine gezielte Tumorzellvernichtung durchgeführt werden. Voraussetzung hierfür ist allerdings die Kenntnis der proliferationskinetischen Daten des jeweiligen Tumors.

Eine individuelle zytostatische Therapie basiert somit auf folgenden 3 Punkten:

1. Sensibilitätstestung von Tumoren gegenüber verschiedenen Zytostatika,
2. Bestimmung der jeweiligen Tumorzellgenerationszeiten und deren Teilphasen und
3. Synchronisation der Tumorzellpopulation als Voraussetzung für eine gezielte Vernichtung der Malignomzellen durch phasenspezifischen Einsatz verschiedener Zytostatika innerhalb des Generationszyklus.

Diese 3 Punkte sind die Hauptthemen, auf die in der vorliegenden Arbeit im Rahmen tierexperimenteller Untersuchungen eingegangen werden soll.

2. SENSIBILITÄTSTESTUNG VON TUMOREN

2.1. EINLEITUNG

Tumore, die bezüglich ihrer Lokalisation und ihres histologischen Bildes völlig identisch sind, können eine erhebliche Individualität in ihrer Sensibilität gegenüber Zytostatika aufweisen (DiPAOLO, 1965; BICKIS und HENDERSON, 1966; BICKIS, HENDERSON und QUASTEL, 1966; TANNEBERGER, 1968). Der Grund hierfür scheint hauptsächlich im unterschiedlichen biochemischen Verhalten der Tumorzelle zu liegen, obgleich auch die Immunlage und die metabolische Situation des einzelnen Patienten eine wichtige Rolle spielen dürfte (KARNOWSKY, 1956; DRUCKREY, 1963; JOHNSON, 1963; WERKHEISER, 1963; WHEELER, 1963; BICKIS und HENDERSON, 1966; TANNEBERGER, 1968). Eine blinde Kollektivbehandlung von Tumoren kann aber nun nicht nur unwirksam sein, sondern sogar eine raschere Tumorausbreitung zur Folge haben. SCHMÄHL (1963) und LIMBURG und KRAHE (1964) konnten an Hand von Tierversuchen zeigen, daß eine Vorbehandlung von Ratten vor

der Transplantation eines Yoshida-Sarkoms mit einem Zytostatikum wie z.B. Endoxan oder Trenimon zu einem erhöhten Tumorangang, zu schnellerem Tumorwachstum und zu einer Erhöhung der Metastasenfrequenz führte und daß Tiere, die mit Zytostatika behandelt worden waren, welche keine Wirkung auf den vorliegenden Tumor zeigten, eher starben, als unbehandelte. Diese Ergebnisse lassen eine individuelle Tumorbehandlung nach vorhergehender Austestung in vitro geraten erscheinen. Solche Testungen werden seit einigen Jahren neben in vitro inkubierten Gewebeschnitten und Zellsuspensionen hauptsächlich an Zell- und Gewebekulturen durchgeführt. Als Kriterien der zytostatischen oder zytotoxischen Effekte der applizierten Medikamente werden hauptsächlich morphologische und biochemische Veränderungen der verwendeten Zellsysteme ausgewählt. Als Ausdruck morphologisch faßbarer zytostatischer Wirkungen werden z.B. toxische Granulationen der Zellen, Pyknose, Vakuolisierung, Zytolyse, Verminderung der Mitosenzahl, chromosomale Veränderungen, Verklumpung der Zellen untereinander und ihre Abrundung und Ablösung aus dem Gewebezellverband in der Kultur gesehen (EAGLE, 1956, EAGLE, 1958, HIRSCHBERG, 1958, COBB, 1961, McBRIDE, 1961). COBB (1961) und

VJELDE (1956) betrachteten die Wachstumsraten von Explantaten unter Zytostatikaeinwirkung als Sensibilitätskriterien, während McALLISTER (1959), SIGEL (1960), SMITH (1960), GRADY (1960), LEITER (1962) und KUPIECKI (1965) die Zellzahl bzw. den Proteingehalt von Tumorphyspopulationen vor und nach Zytostatikazugabe als Diskriminante heranzogen. Biochemische Unterscheidungsmerkmale der zytostatischen Wirkung an explantierten Zellen sind vor allem Veränderungen der Dehydrogenaseaktivität, der Glykolyse und des pH des Kulturmediums (McALLISTER, 1959, BLACKMORE, 1960, TOPLIN, 1961, DiPAOLO, 1963, DiPAOLO, 1964). Einen weiteren wichtigen Schritt zur Erlangung möglichst objektiver Parameter bei der Bewertung der Stoffwechselwirksamkeit von Substanzen die einer entsprechenden Testkultur zugeführt wurden, stellt die Verwendung von radioaktiven Präkursoren der DNS-, RNS- und Proteinsynthese dar. Zellen und Gewebe inkorporieren auch nach einer Explantation in vitro Substanzen, die im Synthese- und Energiestoffwechsel umgesetzt werden. Radioaktiv markierte Verbindungen wie z.B. ^3H -Thymidin (^3H -TdR), ^3H -Uridin (^3H -UdR) oder ^3H -Leucin werden dabei,

wenn sie einem Nährmedium beigelegt sind, von den Zellen in gleicher Art und Weise inkorporiert wie die entsprechenden unmarkierten Stoffe. Die nun in vitro eingebauten Aktivitätsmengen der radioaktiven Substanzen können autoradiographisch oder mittels eines Flüssigkeitszintillationszählers gemessen werden und stellen einen objektiven Maßstab für die Intensität spezifischer Reaktionen im Zellstoffwechsel dar (WRBA, 1962; WRBA und RABES, 1962; VEENEMA u.a. 1963; RABES, 1964; BICKIS, HENDERSON und QUASTEL, 1966; RAJEWSKY, 1966; WRBA und RABES, 1966; SÜSS und VOLM, 1968; TCHAO, 1968; TANNEBERGER, 1968; VOLM u.a. 1968; SEIDEL und WEGNER, 1969; ROWLAND, 1969; RABES und JANTSCH, 1970; VOLM, 1970; KUMMER, 1971; MATTERN u.a. 1972). Die Hemmung der Vorläuferinkorporation in Tumorzellen durch ein bestimmtes Zytostatikum kann also nach radiochemischer Auswertung als Maß der spezifischen Wirksamkeit der Substanz bzw. als Gradmesser der Sensibilität des vorliegenden Tumors gegenüber der getesteten Substanz gewertet werden.

Ausgehend von diesen Fakten versuchten wir einerseits eine möglichst rasche und zuverlässige Methode zur praetherapeutischen in vitro Sensibilitätstestung von Tumoren gegenüber verschiedenen Zytostatika zu entwickeln und andererseits, etwaige Unterschiede der Zytostatika-Sensibilität bei identischen Tumoren in Ascites-Form, soliden und Trypsin-dispergierten Form zu eruieren.

Als tierische Testtumoren wählten wir Zajdela-Hepatome, Yoshida-Sarkome und Walker-Carcinome. An menschlichem Tumormaterial standen Wilms-Tumoren und ein szhirrhöses Mamma-Ca zur Verfügung.

Bei der Suche nach einer geeigneten Methode zur Sensibilitätstestung griffen wir als Grundlage auf die Arbeiten von GUPTA (1966), SÜSS (1968), SEIDEL und WEGNER (1966), RABES und JANTSCH (1970) und VOLM (1970) zurück.

2.2. MATERIAL UND METHODIK

2.2.1. SENSIBILITÄTSTESTUNG DES ZAJDELA-ASCITES- HEPATOMS GEGENÜBER ACTINOMYCIN D

Es wurden 180 - 210 Gramm schwere weibliche Wistar-Ratten eigener Zucht verwendet. Sie erhielten Altromin-Standarddiät und Wasser ad libitum und wurden zu je 5 Tieren in Macrolon-Käfigen gehalten. Jedem Tier wurden 0,5ml Zajdela-Ascites-Hepatom (STEWART u.a. 1959) intraperitoneal injiziert. 4 - 6 Tage später erfolgte die Tötung der Ratten durch Nackenschlag. Unter sterilen Kautelen wurden mit einer 5ml-Record-Spritze 4ml Ascites entnommen und in 16ml auf 37,5°C vorgewärmte TCM-199-Nährlösung (MORGAN u.a. 1950) übertragen. Während der anschließenden Zentrifugierung der TCM-Ascites-Suspension für 3min bei 1000 U/min, wurde in einem aliquoten Teil der Suspension die Asciteszellzahl/ml durch Auszählung in einer Erythrozytenzählkammer nach Thoma ermittelt. Sie lag durchschnittlich bei $3 - 4 \times 10^5$ Zellen/ml.

Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand einschließlich des oberhalb der Tumorzellen gelegenen Erythrozytensaumes abpipettiert und verworfen. Die restierenden Asziteszellen wurden nun in 5ml 37,5°C warmer TCM-199-Lösung resuspendiert und dann in 4 Rührsysteme, in die bereits jeweils 15ml TCM-199 vorgegeben waren, übertragen. Die Asziteszellzahl betrug etwa 7×10^4 Zellen/ml Suspensionsflüssigkeit. Die Rührsysteme bestanden aus einem Glaskolben mit einer zentral, rotierenden Glaswendel (EARLE und Mitarbeiter, 1954; WRBA, 1960; RABES, 1967). Die Umdrehungsgeschwindigkeit der Wendeln lag zwischen 10 - 15 U/min.

Um die Temperatur des Nährmediums über eine Versuchsdauer von 30 - 60 min konstant zu erhalten, wurden die Rührwerke im Inneren eines Brutschrankes angebracht. Die dennoch auftretenden Temperaturschwankungen bewegten sich in einem Bereich zwischen 37° und 37,5°C. Allen 4 Rührsystemen wurde zur Beurteilung der RNS-Synthese der Tumorzellen tritiiertes Uridin in einer Konzentration von 1,0 μ C/ml (spezifische Aktivität: 16.300 mC/mMol, Radiochemical Centre, Amersham) zugesetzt. Zwei Rührsystemen wurde zusätzlich Actinomycin D

(Lyovac - Cosmegen, Sharp & Dohme, München) als zytostatisch wirksame Prüfsubstanz in einer therapeutisch anwendbaren Konzentration von $15\mu\text{g/l}$ zugeführt.

Zwei Ansätze dienten also als Kontrollen, während zwei weitere die Testsubstanz in jeweils gleicher Konzentration enthielten.

Durch die Rotation der Glaswendel wurden die Tumorzellen in Suspension gehalten; damit wurde ein intensiver, allseitiger Kontakt zwischen der Zelloberfläche und dem umgebenden Medium gewährleistet.

5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten nach dem Beginn der Inkubation wurden jeweils gleiche Zellsuspensionsmengen (0,5ml) mittels einer Braunüle aus den Rührsystemen entnommen und in Zentrifugenröhrchen übertragen. Zur sofortigen Unterbrechung der weiteren Uridin - 5 - ^3H - Aufnahme und zur gleichzeitigen Fällung hochmolekular gebundener Radioaktivität wurde der entnommenen Tumorzellsuspension jeweils eine gleiche Menge (0,5ml) $1,2\text{n HC10}_4$ zugesetzt. Hierauf wurden die Tumorzellen für 5 Minuten bei 4000U/min zentrifugiert und mehrfach in $0,2\text{n HC10}_4$ und Äthanol-Äther = 1:1 gewaschen. Das zurück-

bleibende Präzipitat wurde nun in 2ml Hyamin (Packard, Frankfurt) über 24 Stunden bei 60°C gelöst. Nach der Übertragung des gelösten Präzipitates in Flüssigkeits-scintillationsgläschen (Packard) und der Zugabe von 15ml Scintillator-Lösung nach BRAY (1960), wurden die Proben nach 24-stündiger Dunkeladaption für jeweils 10min 5mal im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Packard Tricarb 3214) gemessen. Die Spannung des Gerätes betrug 2190 Volt, die Verstärkung 50%. Der Impulshöhendiskriminator des Kanals I war auf 70 - 1000 und des Kanals II auf 460 - 1000 begrenzt. Die Temperatur der Zählkammer lag bei +5°C.

2.2.2. VERGLEICH DER EMPFINDLICHKEIT VON ASCITES-
TUMOREN MIT SOLIDEN GESCHWÜLSTEN UND TRYPSIN-
DISPERGIERTEN SOLIDEN TUMOREN GEGENÜBER ACTI-
NOMYCIN D UND VINCRISTIN.

2.2.2.1. ASCITESTUMOREN (YOSHIDA-ASCITES-SARKOM UND
WALKER-ASCITES-CARCINOM).

Es wurden 180 - 210 Gramm schwere, weibliche Wistar-Ratten eigener Zucht verwendet. Sie erhielten Altromin-Standarddiät und Wasser ad libitum und wurden zu je 5 Tieren in Macrolon-Käfigen gehalten. Jedem Tier wurde eine bestimmte Asciteszellmenge i.p. injiziert: im Falle des Yoshida-Hepatoms $1 - 1,5 \times 10^5$ Zellen und beim Walker-Carcinosarkom 3×10^6 Zellen. Diejenigen Tiere, denen das Yoshida-Sarkom transplantiert worden war, wurden nach 9 Tagen durch Nackenschlag getötet. Ratten mit einem Walker-Carcinom wurden bereits nach 3 Tagen auf die gleiche Weise getötet. Die Aufarbeitung der Ascites-Zellen erfolgte bis zur Einfüllung in die Rührsysteme auf die gleiche Art, wie sie bereits bei dem Zajdela-Ascites-Hepatom beschrieben wurde.

Allen vier Rührsystemen wurde wiederum tritiiertes Uridin zur Beurteilung der RNS-Synthese der Tumorzellen in einer Konzentration von $1,0\mu\text{C}/\text{ml}$ (spez. Aktivität: $16.300\text{mC}/\text{mMol}$, Radiochemical Centre Amersham) zugesetzt. Zwei Ansätze dienten wiederum als Kontrolle, einem dritten Ansatz wurde als zytostatische Testsubstanz Actinomycin D (Lyovac-Cosmegen, Sharp & Dohme, München) in einer Konzentration von $15\mu\text{g}/\text{l}$, einem vierten Ansatz Vincristin (Vincristin Lilly, als Sulfat, Lilly, Gießen) in einer Konzentration von $50\mu\text{g}/\text{l}$ zugesetzt. Beide Zytostatikakonzentrationen wurden wegen ihrer therapeutischen Anwendbarkeit ausgewählt.

Der weitere Versuchsablauf wurde nun modifiziert, um

1. die Asciteszellentnahmen aus den Rührsystemen exakt zum gleichen Zeitpunkt durchführen zu können,
2. die hierbei entnommenen Zellmengen durch genaue Gewichtsbestimmung quantifizieren zu können und um
3. den Ungenauigkeitsfaktor, der durch die unterschiedliche, Hyamin-bedingte Auflösung des oben beschriebenen Präzipitates auftrat, auszuschalten.

Um die simultane Zellentnahme aus allen 4 Rührsystemen zu ermöglichen, wurde jedes Rührwerk an einem seitlichen Ansatzstutzen über einen Gummischlauch (Durchmesser 0,3cm) mit einem Dreiwegehahn verbunden. Von jedem dieser Dreiwegehähne ging ein weiterer Schlauch aus, der dann mit den anderen gemeinsam in eine 200ml Glas-spritze mündete. Die vom dritten Ansatzstutzen der Dreiwegehähne ausgehenden Schläuche endeten jeweils direkt oberhalb von 4grobporigen Filterfritten (Durchmesser 1,0cm). Die 4 Filterfritten waren auf 50ml Erlenmeyerkolben aufgesetzt, in denen mittels einer Motorpumpe ein Unterdruck erzeugt werden konnte. Auf die Glasfritten wurden runde, 0,9cm im Durchmesser messende Filtermembran (Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen) aufgelegt. Diese Filterplättchen waren mittels eines Korkbohrers aus größeren Membranfiltern (Ø 3cm) ausgestanzt worden. Sollte nun zu einem bestimmten Zeitpunkt (15,30 oder 60 Minuten nach Inkubationsbeginn) aus allen 4 Rührsystemen gleichzeitig eine konstante Asciteszell-suspensionsmenge entnommen werden, so wurde zunächst durch ein entsprechendes Einstellen der Dreiwegehähne eine direkte Verbindung zwischen den Rührsystemen und

der 200ml-Spritze hergestellt. Durch vorsichtiges Zurückziehen des Spritzenkolbens wurde nun simultan aus allen vier Rührwerken eine gleiche Menge an Suspensionsmaterial (0,5-0,8ml) in das zur Spritze führende Schlauchsystem aufgenommen. Sodann wurden die Dreiwegehähne umgestellt, so daß eine Verbindung mit den zu den Glasfritten führenden Schläuchen erreicht wurde. Hierauf wurden die vorher aspirierten Asciteszellmengen durch mehrmaliges, kräftiges Auspressen der Spritze aus den Schlauchsystemen auf die Membranfilter entleert. Die Suspensionsflüssigkeit wurde sofort über die Glasfritten in die Erlenmeyerkolben abgesogen. Die Asciteszellen blieben auf der Filtermembran zurück.

Jeweils dreimal wurde das Zellmaterial mit eiskalter Hanks-Lösung, 0,2n HClO_4 und schließlich mit einer Alkohol-Äthermischung von 1:1 gewaschen. Sodann wurden die mit dem Asciteszell-Präzipitat beschichteten Filtermembranen aus den Glasfritten entnommen und in "Platin-körbchen" gelegt: Die Körbchen waren aus 10 - 12 cm langem Platin/Iridiumdraht ($\varnothing$ 0,25mm, Platin/Iridium

85/15% Degussa Hanau, Hanau) hergestellt worden (GUPTA, 1966). Die beschichteten Filtermembranen wurden hierauf zusammen mit den Platin-Iridium-Körbchen in leere Flüssigkeitsszintillationsröhrchen eingebracht und über 24 Stunden im Brutschrank bei 60°C getrocknet.

Das genaue Gewicht des Zellpräzipitates wurde aus der Gewichts Differenz vor und nach der Beschichtung des Membranfilters ermittelt:

Jedes Szintillationsgläschen, einschließlich des beschriebenen Körbchens und der Filtermembran, wurde nach sorgfältiger Reinigung der Gläschen und unter Verwendung von "Einmal-Handschuhen", um jegliche Kontamination durch Hautabscheidungen zu vermeiden, fünfmal leer gewogen und anschließend staubfrei gehalten. Nach 24-stündiger Trocknung des Präzipitates im Brutschrank erfolgte die zweite Wägungsserie. Auch hierbei wurde jedes Gläschen einschließlich der Platin-Iridium-Spirale und der beschichteten Filtermembran wiederum fünfmal gewogen. Der Gewichtszuwachs wurde aus der Differenz der Mittelwerte der einzelnen Wägungen ermittelt. Er betrug durchschnittlich 0,5 - 1,0mg.

Die zahlreichen Wägungen vor und nach der Tumorzellbeschichtung der Filtermembranen war deshalb notwendig, da bei nochmaligem Wiegen des gleichen Szintillatorgläschens unterschiedliche Meßergebnisse erhalten wurden. Als Grund hierfür wurden physikalische Veränderungen des umgebenden Milieus - der Luftfeuchtigkeit und der Temperatur - angesehen. Die Standardabweichung der Meßdaten bei fünfmaliger Wägung gleicher Szintillatorgläschens betrug $\pm 0,035\text{mg}$. Nach den Wägungen wurden die Szintillatorgläschens für 10 Sekunden mit Sauerstoff begast und fest verschlossen. Anschließend wurde der Membranfilter zusammen mit den aufgelagerten biologischen Substanzen im Szintillatorgläschens verbrannt. Diese Verbrennung wurde durch den focussierten Lichtstrahl einer normalen Projektor-Lampe initiiert. Der bei der Veraschung aufgetretene Wasser- bzw. HTO-Dampf (entstanden durch die Verbrennung von Substanzen, die tritiiertes Uridin enthielten) kondensierte an den Wänden des Szintillatorgläschens, während es für 2 min in einem CO_2 -Azeton-Kältebad eingetaucht wurde. Vor-sichtig wurde nun das Gläschens geöffnet und nach Zusatz

von 15ml Szintillator-Lösung nach BRAY und Entnahme des Platin-Iridium-Körbchens wieder verschlossen.

Die Platin-Körbchen wurden über einer Bunsenbrennerflamme bis zur Weißglut erhitzt und standen nach ihrem Abkühlen für eine neue Versuchsserie zur Verfügung. Wie bereits bei den vorhergehenden Versuchen mit dem Zajdela-Hepatom wurden auch jetzt wieder die Proben nach 24stündiger Dunkeladaption im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Packard Tricarb 3214) für jeweils 10 Minuten gemessen. Die Spannung des Gerätes betrug 2190 Volt, die Verstärkung 50%. Der Impulshöhendiskriminator des Kanals I war auf 70 - 1000 und des Kanals II auf 460 - 1000 begrenzt. Die Temperatur der Zählkammer lag bei $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

2.2.2.2. SOLIDE TUMOREN

Um das Yoshida-Sarkom in solider Form zu erhalten, wurden 180 - 210 Gramm schweren, weiblichen Wistar-Ratten eigener

Zucht jeweils $2 - 3 \times 10^5$ Tumorzellen, die man durch Punktion von Yoshida-Ascites-Sarkom-tragenden Ratten erhalten hatte, am linken hinteren Oberschenkel tief intramuskulär injiziert. In gleicher Weise wurde beim Walker-Carcinom verfahren, die hierbei Übertragenen Tumorzellmengen betrugen etwa 3×10^6 Zellen.

14 - 16 Tage nach der Zellimplantation wurden diejenigen Ratten, denen das Yoshida-Sarkom Übertragen worden war, durch Nackenschlag getötet. Die Tumore hatten zu diesem Zeitpunkt eine Größe von 2-3cm im Durchmesser. Etwa die gleiche Größe zeigten die Walker-Carcinome bereits 3 - 6 Tage nach der Tumorzellimplantation. Ratten, denen dieser Tumor transplantiert worden war, wurden deshalb bereits nach Ablauf dieser kurzen Zeitspanne, ebenfalls durch Nackenschlag getötet.

Unmittelbar nach der Tötung der Tiere wurde der Tumor sorgfältig freipräpariert und aufgeschnitten. Mit einer Irislanzette wurden aus peripher gelegenen, makroskopisch nekrosefreien Tumorbezirken möglichst dünne Gewebeschnitte entnommen. Die so erhaltenen Tumorscheibchen wurden nun

mit einer kleinen Schere in eine Anzahl etwa gleich großer Gewebepartikel zergliedert. Die weitere Aufarbeitung der Explantate zu kleinen Gewebequadraten erfolgte unmittelbar anschließend, mit Hilfe einer mechanischen Schneidemaschine (Tissue Chopper, The Mickle Laboratory, Engineering Co., Gomshall, Surrey), die auf einen Vorschub von 300μ eingestellt worden war.

Diese Schichtdicke wurde deshalb gewählt, um sicher zu gehen, daß auch noch die zentralen Areale der annähernd kubischen Explantate in ausreichendem Maße am Stoffwechsel teilnehmen konnten.

Nach WARBURG (1926) gilt für die Dicke eines planparallelen Gewebeschnittes, bei dem die O_2 -Konzentration im Inneren gerade gleich Null ist, folgende Beziehung:

$$d' = \sqrt{8 \cdot C_0 \cdot \frac{D}{A}}$$

d' = Grenzschichtdicke

C_0 = O_2 -Konzentration an der Oberfläche des Schnittes

D = Diffusionskonstante von O_2 für ein bestimmtes Gewebe, bei gegebener Temperatur

d' = 0,3-0,5 mm für Tumormaterial (VQLM, 1972)

Für kugelförmige Explantate erreicht die O_2 -Eindringtiefe, gegenüber dem planparallelen Gewebsschnitt, nahezu doppelte Werte. Die Eindringtiefe r' des Sauerstoffs, kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$r' = \sqrt{6 \cdot C_0 \cdot \frac{D}{A}}$$

Da nun die verwendeten kubischen Explantate eher kugelförmig als planparallel sind, ist anzunehmen, daß die Eindringtiefe des Sauerstoffs eine Mittelstellung zwischen diesen beiden Werten einnimmt (WRBA und RABES 1961):

Bei einer Kantenlänge der Explantate von 300μ ist es also sehr wahrscheinlich, daß bei 1 Atm O_2 -Partialdruck der Sauerstoff auch noch bis zu den zentral gelegenen Anteilen der Gewebestückchen vordringt.

Die kubischen Tumorpartikel wurden nun, je nachdem, ob lediglich eine mechanische Zerkleinerung des soliden Tumorgewebes durchgeführt, oder aber eine weiterführende Aufgliederung durch Trypsin erfolgen sollte, verschieden weiterverarbeitet:

Unmittelbar nach der Zerkleinerung solider Tumorteile durch die Schneidemaschine wurden die entstandenen Gewebelöckchen in eine Petrischale übertragen und in 2 - 3ml TCM 199 suspendiert.

Mit Hilfe einer Pipette wurden nun jeweils 20 Tumorpartikel ausgezählt, zu einer Versuchsgruppe zusammengefaßt und in Roller-Röhrchen, die mit 5ml, auf 37,5°C vorgewärmtem TCM-199 angefüllt waren, überführt. Da die Rollerapparatur im Inneren eines Brutschrankes angebracht war, konnte die Temperatur während der gesamten Versuchsdauer konstant auf 37,5°C gehalten werden. Die Rotationsgeschwindigkeit des Rollers lag bei 15U/min. Hierdurch konnten einerseits die kubischen Explantatartikel in freier Suspension erhalten und andererseits das umgebende Medium gut durchmischt werden. Auf diese Weise wurde ein optimaler Substanztausch zwischen

Medium und Explantat gewährleistet (WRBA und RABES, 1962).

Zu Versuchsbeginn wurde dem Medium als Vorläufer der RNS-Synthese Uridin-5-³H (spez. Aktivität: 16.300mCi/mMol; Radiochemical Centre, Amersham) in einer Dosis von 1µCi/ml zugesetzt. Je 8 Versuchsansätze erhielten Actinomycin D (Lyovac-Cosmegen, Sharp & Dohme, München) in der therapeutisch anwendbaren Konzentration von 15µg/l. Zu je 8 weiteren Ansätzen wurde Vincristin (Vincristin Lilly, als Sulfat, Lilly, Gießen) in einer Dosierung von 50µg/l zugesetzt. 8 Ansätze dienten als Kontrolle und enthielten keine Zytostatika. Versuchs- und Kontrollansätzen wurde tritiiertes Uridin allein (Kontrollen), Uridin-5-³H plus Actinomycin D oder Uridin-5-³H und Vincristin (Testansätze) in Intervallen von 1min zugegeben. Nach jeweils 30 bzw. 60 Minuten wurde der Inhalt der Roller-Röhrchen in eine Pipette aufgesogen und auf die bereits oben beschriebenen Membranfilter entleert. Die weitere Aufarbeitung der Tumorpartikel geschah nun auf gleiche Weise wie bei den Ascitesformen der Yoshida-Sarkome und Walker-Carcinome: Dreimaliges Waschen der Gewebeteilchen mit eiskalter Hanks-Lösung, 0,2n HClO₄ und Äthanol-Äther (=1:1), Ermittlung

der jeweiligen Trockengewichte der Tumorpräzipitate, Mikroveraschung nach GUPTA (1966) und schließlich Bestimmung der in die Proben aufgenommenen Radioaktivitätsmengen mittels des Flüssigkeitsszintillationsspektrometers.

2.2.2.3. TRYPSIN-DISPERGIERTE TUMOREN

Um einen tatsächlichen Vergleich zwischen den RNS-Syntheseraten mit und ohne Actinomycin D bei den mechanisch zerkleinerten und den anschließend durch Trypsinierung noch weiter aufgegliederten Tumorteilchen anstellen zu können, wurden die entsprechenden Versuche immer parallel durchgeführt; d.h., das Gewebe, dessen Stoffwechselreaktionen im Anschluß an die beiden verschiedenen Arten der Aufarbeitung betrachtet wurde, entstammte immer aus demselben Tumor. Ferner wurde sorgfältig darauf geachtet, daß das für die beiden Verarbeitungsmodifikationen verwendete Tumormaterial möglichst aus identischen Geschwulstbezirken entnommen wurde, um sicherzugehen, daß nicht Gewebeteile unterschiedlicher Proliferationsverhältnisse im

Versuch verarbeitet wurden.

Da bei den Trypsinierungsversuchen erst 30-40 Minuten nach der mechanischen Gewebezerkleinerung die Inkubation mit tritiiertem Uridin und Actinomycin D vorgenommen werden konnte, wurden diejenigen Explantate, die nur mechanisch aufgearbeitet werden sollten, wiederum zu je 20 Partikeln pro Ansatz, zusammengefaßt und für diesen Zeitraum in 5ml 37,5°C warme, TCM 199 enthaltende Roller-Röhrchen eingebracht. Die Rotationsgeschwindigkeit der Rollerapparatur lag bei 15U/min.

Diese zeitliche Verschiebung der Aufarbeitung der nur mechanisch zu bearbeitenden Explantate wurde aus folgenden Gründen vorgenommen: Erstens konnte hier durch die Versuchsdurchführung rationeller gestaltet werden, da der weitere Versuchsablauf nach der Trypsinierung für beide Explantatgruppen völlig identisch war und weil zweitens der zeitlich bedingte Vitalitätsverlust der Tumorzellen auf diese Weise in beiden Versuchen gleich groß gehalten werden konnte.

Die Trypsinierung der kubischen Gewebeexplantate von 300µ Kantenlänge, die auf die oben beschriebene Weise erhalten werden konnten, wurde auf der Basis der Arbeiten von

DULBECCO und VOGT (1954), YOUNGER (1954) und RAPPO-
PORT (1956) durchgeführt.

Die Gewebepartikel wurden in Calcium- und Magnesium-
freie Tyrodelösung unter Zusatz von 0,25% Trypsin
(Difco) aufgenommen und in einen von RAPPOPORT (1956)
entwickelten Trypsinierungskolben übertragen. Durch
einen Magnetrührer (Bell-Stir, Magnetic Stirrer, Bel-
lco - Glass Inc., Vineland, New Jersey) wurden die Ge-
webeteilchen im Trypsinierungsgefäß in Suspension ge-
halten. Die Rührgeschwindigkeit wurde so gewählt, daß
einerseits starke Turbulenzen erzeugt wurden, von denen
die Gewebepartikel mitgerissen wurden, andererseits aber
eine Schaumbildung gerade vermieden werden konnte.

Der Trypsinierungsvorgang wurde in einem Brutschrank
bei 37,5°C geführt.

15, 20, 25, 30, 35 und 40 Minuten nach Trypsinierungsbe-
ginn wurde der Rührvorgang kurze Zeit unterbrochen. Mit
einer Pipette wurden zu diesen Zeitpunkten jeweils 20ml

Suspensionslösung aus dem Rapoport-Kolben entnommen und in bereitgestellte Erlenmeyerkolben (50ml) übertragen. Die aus dem Trypsinierungsgefäß entnommenen Flüssigkeitsmengen wurden umgehend durch frische, auf 37,5°C vorgewärmte 0,25% Trypsinlösung ersetzt. Um eine weitere Trypsin - bedingte Andauung des entnommenen Zellmaterials zu verhindern, wurde den entnommenen Proben jeweils 15ml Kälberserum zugesetzt. Es wurde hierbei von der Voraussetzung ausgegangen, daß die Trypsininhibitorkapazität von 1ml Serum ausreicht, um etwa 1mg Trypsin zu hemmen (Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen (1968), Basel).

Die in 5-Minuten-Abständen entnommenen und inaktivierten Proben wurden dann jeweils für 3 Minuten bei 10000/min zentrifugiert. Nach Decantierung des Überstandes wurden die sedimentierten Tumorzellen in 37,5°C warmer TCM-199-Lösung resuspendiert. Ein aliquoter Teil, der zu den einzelnen Zeitpunkten entnommenen Zellsuspensionen wurde in 37,5°C warmer 0,2% Lissamin-Grün-Lösung für 15min inkubiert und anschließend auf Objektträgern ausgestrichen. An Hand der Mikroskopierung dieser Präparate konnte festgestellt werden:

1. inwieweit die Zellisolierung zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten bereits fortgeschritten war und

2. wieviele Zellen durch mechanische (Rührkern) oder chemische (Trypsin) Einwirkungen bereits irreversibel geschädigt worden waren.

Letzteres war auf Grund der Tatsache möglich, daß sich nur devitalisierte Zellen mit Lissamin-Grün anfärben, während vitale Zellen diesen Farbstoff nicht aufnehmen (HOLMBERG, 1961).

Pro Ausstrich wurden jeweils 100 Zellen pro Ansatz mikroskopisch ausgewertet und ein sog. Lissamin-Grün-Index erstellt. Für den weiteren Versuchsablauf wurden nur diejenigen Ansätze verwendet, bei denen einerseits eine genügend große Menge isolierter Zellen vorhanden war und andererseits ein Lissamin-Grün-Index von 5% (5 devitalisierte Zellen bei 100 ausgewerteten) nicht überschritten wurde.

Die Zellsuspensionen der ausgewählten Versuchsansätze wurden nun für 3 min bei 1000U/min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Zellsediment wurde dann in frischer TCM-199 resuspendiert und in Roller-Röhrchen übertragen. Dem Medium wurde dann jeweils Uridin-5-³H als Vorläufer der RNS-Synthese in einer Konzentration von 1µCi/ml (spezifische Aktivität: 16.300mCi/mMol, Radiochemical Centre, Amersham) zugesetzt. Je 8 Versuchsansätzen

wurde zusätzlich Actinomycin D (Lyovac-Cosmegen, Sharp & Dohme, München) in einer Dosis von $15\mu\text{g}/\text{l}$ beigegeben.

8 Ansätze dienten als Kontrolle.

Der weitere Versuchsablauf war mit dem Vorgehen bei lediglich mechanisch zu zerkleinernden, soliden Tumoren identisch und ist dort beschrieben.

2.2.3. SENSIBILITÄTSTESTUNG EINES MENSCHLICHEN MAMMA-CARCINOMS UND EINES WILMS-TUMORS GEGENÜBER ACTINOMYCIN D UND VINCRISTIN

Bei der Verarbeitung und Austestung dieser Tumore wurde grundsätzlich ebenso verfahren, wie beim soliden Yoshida-Sarkom und Walker-Carcinom der Ratte:

Mit einer Irislanzette wurden aus peripher gelegenen, makroskopisch nekrosefreien Tumorbezirken möglichst dünne Gewebeschnitte entnommen. Diese wurden dann zunächst mit einer Schere zerkleinert und anschließend mit Hilfe der Schneidemaschine (Tissue Chopper, The Mickle Laboratory, Engineering Co., Gomshall, Surrey) zu Gewebelöckchen von 300μ Kantenlänge weiterverarbeitet. Je 20 Tumorpartikel

wurden mit einer Pipette ausgezählt, zu einer Versuchsgruppe zusammengefaßt und in Roller-Röhrchen, die mit 5ml, auf 37,5°C vorgewärmtem TCM-199 angefüllt waren, übertragen. Zu Versuchsbeginn wurde dem Medium als Vorläufer der RNS-Synthese Uridin-5-³H (spez. Aktivität: 16.300mCi/mMol, Radiochemical Centre Amersham) in einer Dosis von 1µCi/ml zugesetzt. Je 8 Versuchsansätze erhielten Actinomycin D (Lyovac-Cosmegen, Sharp & Dohme, München) in der therapeutisch anwendbaren Konzentration von 15µg/l. Zu je 8 weiteren Ansätzen wurde Vincristin (Vincristin Lilly, als Sulfat, Lilly, Gießen) in einer Dosierung von 50µg/l zugesetzt. 8 Ansätze dienten als Kontrolle und enthielten keine Zytostatika. Nach jeweils 30 bzw. 60 Minuten wurde der Inhalt der Roller-Röhrchen in eine Pipette aufgesogen, auf die Membranfilter entleert, dreimal mit eiskalter Hanks-Lösung, 0,2nHClO₄ und Äthanol-Äther (1:1) gewaschen und schließlich die jeweiligen Trockengewichte der Tumorzellpräzipitate ermittelt. Hierauf wurde wiederum die Mikroveraschung nach GUPTA (1966) durchgeführt und die in die Proben aufgenommenen Radioaktivitätsmengen mittels des Flüssigkeitsszintillationsspektrometers gemessen.

2.3. ERGEBNISSE DER SENSIBILITÄTSTESTUNG VON ZAJDELA-
ASCITES-HEPATOMEN, YOSHIDA-SARKOMEN (ASCITES UND
SOLIDE FORMEN) WALKER-CARCINOMEN (ASCITES, SOLIDE
FORMEN, TRYPSINIERTER SOLIDE FORMEN), EINEM MENSCH-
LICHEN MAMMACARCINOM UND EINEM WILMS-TUMOR GEGEN-
ÜBER ACTINOMYCIN D UND VINCRISTIN

Als Maß für die Sensibilität eines Tumors gegenüber einer zytostatisch wirksamen Substanz kann der sog. $\frac{t}{c}$ -Index herangezogen werden (SEIDEL und WEGNER, 1969).

Hierbei steht "t" für "treated" (= mit einem Zytostatikum "behandelte" Zellen) und "c" für "control" (Kontrollwert). Ein $\frac{t}{c}$ -Wert von 0,6 würde also bei dem im vorliegenden Fall durchgeführten Testverfahren, eine 40%ige Hemmung des RNS - Stoffwechsels durch ein bestimmtes Zytostatikum bedeuten.

Da die Inkorporationsraten der Kontrollen und der Testansätze mit Vincristin für alle hier betrachteten Tumormformen praktisch identisch sind und somit bei der gewählten Vincristinkonzentration von $50\mu\text{g/l}$ während eines Versuchszeitraums von 60 Minuten keine Beeinträchtigung der RNS-Syntheseaktivität wahrgenommen werden konnte, mußte auf eine Berechnung der $\frac{t}{c}$ -Indices für Vincristin verzichtet werden.

Die Hemmung der RNS-Syntheseaktivität durch Actinomycin D war bei allen betrachteten Tumoren ausgeprägt. Beim Zajdela-Hepatom (Abb. 1) wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten in 5-Minuten-Abständen die Impulszahl der Kontrollwerte und der Proben mit Actinomycin D - Zusatz bestimmt. Setzt man nun die in den Versuchen mit Actinomycin D gewonnenen Impulsraten zu den Impulsraten der Kontrollgruppen ins Verhältnis, so erhält man zu den einzelnen Zeitpunkten folgende $\frac{t}{c}$ -Indices (Tab. 1):

Inkubationsdauer der Tumorzellen	Imp./min		$\frac{t}{c}$ -Index
5min	$\frac{120}{145}$	=	0,63
10min	$\frac{159}{244}$	=	0,65
15min	$\frac{184}{268}$	=	0,69
20min	$\frac{214}{292}$	=	0,73
25min	$\frac{262}{352}$	=	0,74
30min	$\frac{264}{386}$	=	0,68

Tab. 1: Verhältnis der bei den Versuchen mit Actinomycin C gewonnenen Impulsraten zu denen der Kontrollgruppen ($\frac{t}{c}$ -Indices) bei Zajdela-Hepatomen.

Die Hemmung der durch Actinomycin D bewirkten Uridin-
5-³H Inkorporation liegt also während des betrachteten
Versuchszeitraums von 30 Minuten zwischen den Extrem-
werten von 37%(nach 5minütiger Inkubationsdauer)und 26%
(nach 25minütiger Inkubationsdauer).

Bestimmt man den $\frac{t}{c}$ Index bei der Ascites-Form der Yoshi-
da-Sarkome, wobei wiederum Actinomycin D als zytostatisch
wirksame Substanz herangezogen wurde, so findet man eine
recht genaue Übereinstimmung mit dem entsprechenden Wert
für den soliden, mechanisch zerkleinerten Tumor derselben
Art (Tab. 2):

Inkubationsdauer der Tumorzellen	$\frac{t}{c}$ -Index der Ascites-Form	$\frac{t}{c}$ -Index der soliden, mech.zerkleinerten Tumorform
60min	0,61	0,63

Tab.: 2 $\frac{t}{c}$ -Index der Ascites- und der soliden, mechanisch
zerkleinerten Yoshida-Sarkom-Form nach 60minütiger
Inkubation mit Actinomycin D (15 μ g/l)

Bei den Ascites-Formen der Yoshida-Sarkome ist also nach 60minütiger Einwirkung des Actinomycin D auf die Tumorzelle die Aufnahme des radioaktiven Uridin gegenüber den Kontrollwerten um 39% verringert. Bei den soliden, mechanisch zerkleinerten Formen dieses Tumors wurden nach 60minütiger Inkubation eine Uridineinbauhemmung etwa gleichen Ausmaßes (37%) festgestellt.

Auch bei den Walker-Carcinomen sind die $\frac{t}{c}$ -Indices unter Actinomycin-D-Einwirkung für die Ascites-Formen, die soliden, mechanisch zerkleinerten Formen (sowohl bei einem Tumoralter von 3 (=a), als auch von 6 Tagen (= b) und die Trypsin-dispergierten Formen annähernd identisch (Tab. 3):

Inkubationsdauer
der Tumorzellen

	Formen des Walker-Carcinoms			
	Ascites, a	solid, mech. zerk., a	solid, trypsin., b	solid, trypsin., b
30min	0,52	0,54	0,51	0,51
60min	0,50	0,58	0,46	0,49

Tab.: 3 $\frac{t}{c}$ -Indices nach 30 bzw. 60minütiger Inkubation der Ascites-, der soliden, mechanisch zerkleinerten - und der soliden, Trypsin-dispergierten Walker-Carcinom -Form mit Actinomycin D (15 μ g/l).

a = Tumoralter von 3 Tagen

b = Tumoralter von 6 Tagen

Die durch Actinomycin D gegenüber den Kontrollen bedingte Hemmung des RNS-Stoffwechsels, liegt also bei den betrachteten Formen und Verarbeitungsweisen der Walker-Carcinome etwa bei $51,3 \pm 3,5\%$.

Bei den getesteten menschlichen Tumoren, einem Wilms-Tumor und einem Mamma-Carcinom, wurden folgende $\frac{t}{c}$ -Indices errechnet: (Tab. 4):

Inkubationsdauer der Tumorzellen	Wilms-Tumor $\frac{t}{c}$ -Index	Mamma-Carcinom $\frac{t}{c}$ -Index
30min	0,45	0,54
60min	0,50	0,41

Tab.: 4 $\frac{t}{c}$ -Indices eines Wilms-Tumors und eines Mamma-Carcinoms nach 30 bzw. 60minütiger Inkubation mit Actinomycin D (15ug/l).

Die Hemmung des RNS-Stoffwechsels durch Actinomycin-D ist also bei diesen beiden menschlichen Tumoren etwa ebenso groß wie beim Walker-Carcinom (um 50%).

Trägt man die durch die Inkorporation von Uridin-5-³H hervorgerufenen und im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gemessenen Impulse/min/mg-Präzipitattrockengewicht in Abhängigkeit von der Zeit in einem Diagramm auf (Abb. 1-8), so findet man bei allen Tumoren während eines Beobachtungszeitraumes von 60min für die Kontrollwerte, die Testansätze mit Vincristin und die Testansätze mit Actinomycin D einen linearen Anstieg. Während die Gerade bei den Kontrollen und den Testansätzen mit Vincristin relativ steil ansteigt, verläuft sie bei den Ansätzen mit Actinomycin D deutlich flacher.

Der Kurvenverlauf der trypsinierten Proben ist mit dem der soliden, lediglich mechanisch aufgearbeiteten Tumorsansätze weitgehend identisch (Abb. 2). In allen Fällen liegen die zu den einzelnen Meßzeitpunkten gemittelten Impulswerte/min/mg-Trockengewicht im Bereich der Standardabweichung der Mittelwerte.

Die relativen Inkorporationsraten von radioaktivem Material liegen bei den Kontrollansätzen der Walker-Carcinome nach 60 Minuten sowohl für die Ascites-Formen (Abb. 3) mit 445 ± 40 Imp./min/mg-Trockengewicht, als auch für die soliden,

lediglich mechanisch aufgearbeiteten, mit 419 ± 31 Imp./min/mg-Trockengewicht (Abb. 2) und den, nach der mechanischen Aufarbeitung trypsinisierten Formen (Abb. 2) mit 410 ± 32 Imp./min./mg-Trockengewicht etwa gleich hoch. Unter Actinomycin-D-Einwirkung sind die Inkorporationsraten beim gleichen Tumor in der Ascites-Form mit 221 ± 42 Imp./min/mg-Trockengewicht (Abb. 3), in solider, lediglich mechanisch zerkleinerter Form mit 190 ± 37 Imp./min/mg-Trockengewicht und in solider, Trypsin-dispergierter Form mit 200 ± 47 Imp./min./mg-Trockengewicht (Abb. 2) zwar wiederum auf etwa gleicher Höhe, doch sind diese Werte insgesamt weit niedriger als die der zugehörigen Kontrollansätze.

Bei den soliden, lediglich mechanisch zerkleinerten Formen von 3 Tage alten Walker-Carcinomen (Abb. 4) finden sich nach 60minütiger Uridin-5-³H Inkubation sowohl für die Kontrollen mit 480 ± 30 Imp./min/mg-Trockengewicht, als auch für die Actinomycin-D-Ansätze mit 320 ± 40 Imp./min/mg-Trockengewicht etwas höhere Inkorporationsraten als bei den übrigen Walker-Carcinom-Formen. Auf diese Tatsache

wird in der Diskussion eingegangen. Vergleicht man die Inkorporation nach 60 Minuten bei Ascites-Formen (Abb. 5) und soliden, lediglich mechanisch aufgearbeiteten Formen (Abb. 6) von Yoshida-Sarkomen miteinander, so liegen sowohl die Kontrollwerte mit 420 ± 22 Imp./min./mg-Trockengewicht bzw. 435 ± 45 Imp/min/mg-Trockengewicht, als auch die Impulsraten der Actinomycin-D-Testansätze mit 257 ± 19 Imp/min/mg-Trockengewicht bzw. 275 ± 30 Imp/min/mg-Trockengewicht bei den beiden Tumorformen sehr nahe beisammen.

Die Inkorporationsraten unter Vincristinzusatz entsprechen sowohl bei den Ascites-Formen (Abb. 5) mit 408 ± 17 Imp/min/mg-Trockengewicht als auch bei den soliden, mechanisch zerkleinerten Formen (Abb. 6) 441 ± 36 Imp/min/mg-Trockengewicht weitgehend den Kontrollwerten. Auch bei dem soliden, lediglich mechanisch aufgearbeiteten Wilms-Tumor (Abb. 7) ist praktisch kein Unterschied der relativen Inkorporationsraten an radioaktivem Material zwischen den Kontrollen und den Vincristin-Testansätzen zu beobachten. Sie liegen nach 60 Minuten bei 265 ± 35 Imp/min/mg-Trockengewicht (Kontrollen) und 270 ± 34 Imp/min/mg-Trockengewicht (Vincristinzusatz). Die Inkorporationsmenge unter Actinomycin-D-Einwirkung liegt nach 60 Minuten 130 ± 15 Imp/min/mg-Trocken-

gewicht deutlich tiefer. Entsprechende Verhältnisse liegen auch beim menschlichen Mamma-Carcinom (Abb. 8) vor: Während nach 60 Minuten die Uridin-5-³H Inkorporationsmengeⁿ der Kontrollen und der Ansätze mit Vincristinzusatz praktisch auf gleicher Höhe liegen - 690 ± 42 Imp/min/mg-Trockengewicht (Kontrollen) und 733 ± 32 Imp/min/mg-Trockengewicht (Vincristinansätze) liegen die Werte für Actinomycin D mit 280 ± 37 Imp/min/mg-Trockengewicht deutlich tiefer.

2.4. DISKUSSION

Bei den 36 getesteten Tumoren findet sich während des Versuchszeitraums von 60 Minuten sowohl bei den Kontrollen, als auch bei den Testansätzen eine konstante Zunahme der Uridin-5-³H Inkorporation in Abhängigkeit von der Zeit. Nach 60minütiger Versuchsdauer liegen die Inkorporationsmengen der Ascites-Formen und der soliden Formen identischer Tumore etwa gleich hoch.

Dieses Ergebnis ist deshalb etwas Überraschend, da anzunehmen ist, daß die Stoffwechselbedingungen der inkubierten Zellen in den einzelnen Versuchsansätzen unterschiedlich sind. Optimale Bedingungen sind bei den Ascites-Zellsuspensionen anzutreffen, da die Zellen isoliert liegen und deshalb allseitig vom Nährmedium umgeben sind. Substanzen, die der Inkubationslösung beigegeben werden, wie z.B. tritiiertes Uridin, können mit jeder Zelle in unmittelbaren Kontakt treten.

Ungleich ungünstiger als bei den Ascites-Zellen, sind die Stoffwechselverhältnisse in einer Aufschwemmung solider Organexplantate. Die Ernährung der Explantate erfolgt durch Diffusion, wobei die Oberfläche der Gewebepartikel die einzige Kontaktfläche zum umgebenden Medium darstellt. Substanzen, die der Nährlösung beigegeben werden, können nicht in direkten Kontakt mit allen Zellen treten und erreichen auch, je mehr sich die Gewebedicke der Grenzschicht annähert, um so seltener Zellen in zentralen Teilen der Explantate. Sind also die Inkorporationsraten an tritiiertem Uridin nach 60minütiger Versuchsdauer sowohl bei den Ascites-suspensionen, als auch bei den soliden, mechanisch zerkleinerten Explantatsuspensionen trotzdem etwa gleich hoch, so kann hierfür eine vermehrte Stoffwechselaktivität der Explantatsuspensionen verantwortlich sein. Eine Verschlechterung der Stoffwechselverhältnisse bei den Ascites-Suspensionen und eine daraus resultierende Angleichung an die Uridin-5-³H Inkorporation der Explantatgruppe ist zwar denkbar, aber im vorliegenden Fall sehr unwahrscheinlich.

Die im Vergleich zu den Zellsuspensionen hohe Inkorporation von ^3H -Uridin durch die Tumorexplantate kann auf folgenden Gründen beruhen:

Durch die geringe Größe der Explantate mit einer Kantenlänge von 300μ wird die kritische Grenzschichtdicke nicht erreicht, selbst zentrale Gewebeabschnitte können noch durch Diffusion ernährt werden und tritiiertes Uridin aufnehmen.

Bei der Zusammenstellung der einzelnen Versuchsansätze wurde besonders darauf geachtet, daß die verwendeten 20 Tumorpartikel möglichst gleich groß waren. Inhomogene Versuchsansätze könnten wiederum durch unterschiedliche Dicke der einzelnen Tumorpartikel die Stoffwechselverhältnisse verschlechtern.

Durch die Inkubation der Gewebestückchen in freier Suspension in Roller-Röhrchen wurde ein besserer Substanz-austausch zwischen den Explantaten und dem Medium gewährleistet.

Die Tatsache, daß zwischen den trypsinisierten und den lediglich mechanisch zerkleinerten Tumorformen ebenfalls keine deutlichen Inkorporationsunterschiede auftreten, ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß es mit Hilfe der Lissamin-Grün-Färbung und der mikroskopischen Auswertung von Ausstrichpräparaten möglich war, diejenigen Proben für den weiteren Versuchsablauf auszuwählen, bei denen einerseits eine genügend große Menge isolierter Zellen vorhanden war und andererseits die Zahl der devitalisierten Zellen noch unter 5% (Lissamin-Grün-Index) lag.

Auffällig ist das unterschiedliche Verhalten der Inkorporationsraten bei den beiden soliden Walker-Carcinom-Gruppen, die zwar auf die gleiche Weise bearbeitet wurden, sich aber hinsichtlich ihres Alters unterschieden:

Während das Tumoralter der einen Gruppe bei 3 Tagen lag (Abb. 4), waren die Tumoren der anderen Gruppe mit 5 - 8 Tagen (Abb. 2) doppelt so alt.

3 Tage alte Walker-Carcinome weisen sowohl in den Kontrollen, als auch in den Actinomycin-D-haltigen Testan-

sätzen höhere relative Impulswerte auf als die 5-6 Tage alten Tumore der gleichen Art.

Berücksichtigt man das unterschiedliche Alter der Neoplasmen, so kann man annehmen, daß sich ein 3Tage alter Walker-Tumor noch in einer exponentiellen Wachstumsphase mit gesteigerter Proliferation und erhöhter RNS-Synthese befindet, während der 5-6Tage alte Tumor kein exponentielles Wachstum mehr zeigt und geringere Proliferation neben einer reduzierten RNS-Synthese aufweist (MENDEL-SOHN, 1963, BASERGA, 1965, LENNARTZ und MAURER 1964).

Betrachtet man in den Abbildungen 1 - 8 die durch Actinomycin-D und Vincristin hervorgerufene Beeinflussung der RNS-Synthese, so findet man in dem Beobachtungszeitraum von 60 Minuten in allen Fällen eine lineare Abhängigkeit zwischen der Inkorporationsdauer und der inkorporierten radioaktiven Uridinmenge. Dies findet auch in den für die Actinomycin-D-Wirkung erstellten $\frac{t}{c}$ -Indices seinen Niederschlag: Zu verschiedenen Meßzeitpunkten sind sie immer etwa gleich groß. Dies bedeutet, daß Actinomycin-D in der verwendeten Konzentration von $15\mu\text{g}/\text{l}$ unter dem Beobachtungszeitraum von 60 Minuten zwar in jedem Fall die

RNS-Synthese stark unterdrückt, aber niemals total hemmt. Actinomycin D scheint die RNA-Synthese-Rate zu hemmen; ob dieser verlangsamte Einbau von ^3H -Uridin sich auf spezifische Species der RNA oder auf die gesamte RNA-Synthese-Rate bezieht, ist aus der Versuchsgestaltung und den Ergebnissen nicht zu entnehmen. Die unterschiedliche Wirkungsintensität des Actinomycin-D bei der Anwendung auf die vorliegenden Tumoren kann nur hypothetisch behandelt werden: neben Faktoren, wie unterschiedliche Möglichkeiten in die Zelle einzudringen und zum eigentlichen Wirkungsort fortzuschreiten, dürfte eventuell auch noch der Gehalt der Tumorzellen an dem Purindesoxynukleotid Desoxyguanosin-Monophosphat (dGMP) eine wichtige Rolle spielen; Actinomycin D verbindet sich mit dieser Substanz und blockiert von hier aus die DNS-abhängige RNS-Synthese. Man könnte also annehmen, daß Tumorzellen mit einem hohen Gehalt an dGMP dem Actinomycin D mehr Kontaktpunkte anbieten und so diesem Stoff gegenüber sensibler sind.

Die Wirkungsweise von Actinomycin D - Verbindung mit dGMP und Blockade der DNS-abhängigen RNS-Synthese - wurde bereits von den verschiedensten Autoren beschrieben (De VINCENTIIS, 1959; REICH, 1961; GIUDICE, 1963; PERRY, 1963; BASERGA et al, 1965a; BASERGA et al 1965b; MITTERMAYER et al 1965; RO, 1966; DJORDJEVIC, 1968; KIM et al 1968; SCHWARTZ, 1968a; SCHWARTZ, 1968b; MAASS, 1970; FISCHER, 1970; DOIDA, 1972).

Vincristin, das vorwiegend stathmokinetiche Effekte (CUTTS, 1961) und in sehr geringem Maße auch depressorische Wirkungen auf die RNS- und Protein-Synthese ausüben soll (CLINE, 1968; SLOTNICK, 1968) zeigte in unseren Versuchen keinerlei Wirkung auf die RNS-Synthese. Die Inkorporationsraten von Uridin-5-³H waren bei den Testansätzen mit Vincristin immer den Kontrollen gleich. Aufgrund dieser Feststellung kann aber nun keineswegs gefolgert werden, daß Vincristin keinerlei Wirkung auf den getesteten Tumor ausübt. Man muß sich vielmehr vor jeder Testung überlegen, welche Parameter des Tumor-

stoffwechsels in Gegenwart welcher Substanzen geprüft werden soll. Eine grundlegende Voraussetzung für jede in-vitro-Testung ist daher auch die genaue Kenntnis der zytostatischen Wirkungsmechanismen der applizierten Substanz. Weiterhin ist bei der Übertragung des Tumorverhaltens (KUMMER, 1971) gegenüber einem Zytostatikum von in vitro auf in vivo Verhältnisse Vorsicht geboten. Zwar kann man bei den hier beschriebenen in-vitro-Methoden davon ausgehen, daß die explantierten Gewebe noch ein gewisses in-vivo-Verhalten zeigen, doch werden bei der Zytostatikaaustestung vom Inkubationsmilieu her Idealbedingungen geschaffen, die in vivo normalerweise nicht vorliegen (LETTRE, 1965). So ist während der gesamten Versuchsdauer die Testsubstanz in gleicher Konzentration vorhanden und das zu prüfende Zytostatikum kann direkt auf die Tumorzelle einwirken. In vivo dagegen kann die Konzentration der Wirksubstanz durch eine mögliche Anreicherung in einzelnen Organen und durch Ausscheidung aus dem Organismus nicht konstant gehalten werden. Weiterhin ist die Konzentration, die schließlich im Tumor selbst anzutreffen ist, weitgehend von dessen Vaskulari-

sierung abhängig. Man kann also wie LETTRE.(1965) durchaus eine Wirksubstanz annehmen, die zwar in vitro hervorragende Eigenschaften besitzt, in vivo aber gar keine Wirkung erbringt, da sie nicht in der notwendigen Konzentration in den Tumor gelangt.

Weiß man allerdings die Aussagekraft einer Kurzzeittestung richtig einzuschätzen, so ist sie trotzdem bei der Auswahl der Zytostatika ein wichtiges Hilfsmittel für eine effektive Tumorbehandlung.

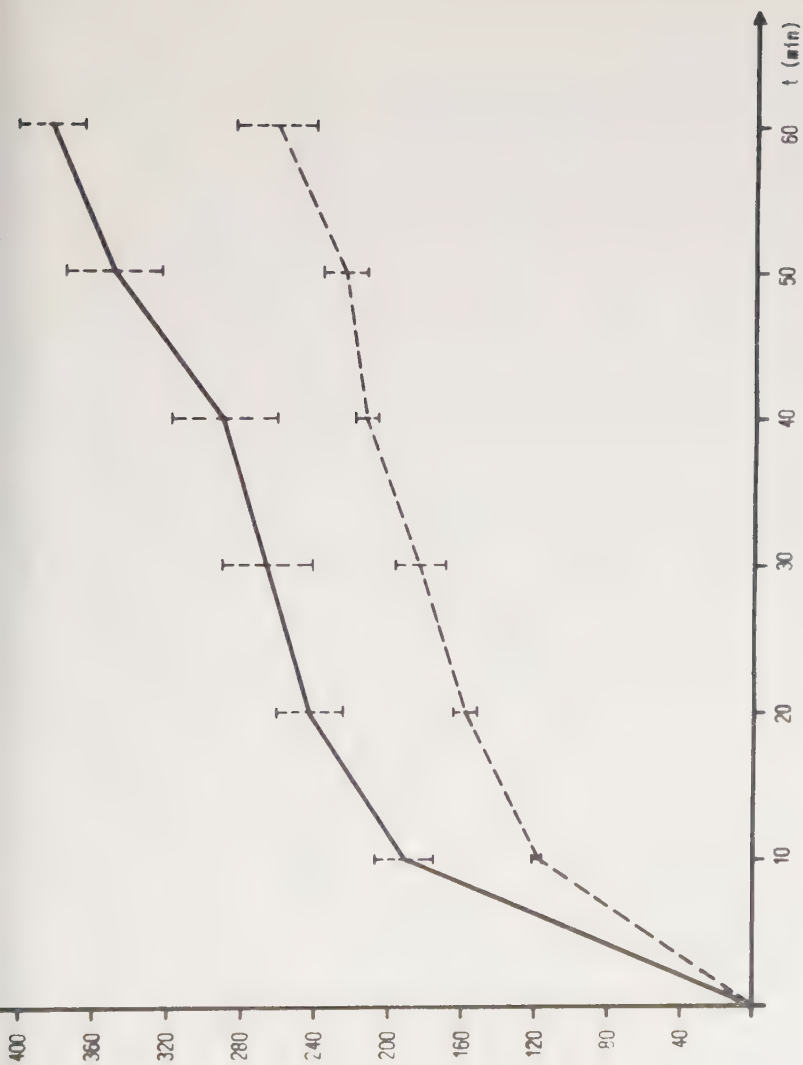


Abb. 1 : ^3H -Uridin-Einbau in Aszites-Zellen eines Zajdel-Hepatoms unter Einwirkung von Actinomycin D (15 $\mu\text{g/l}$).

Kontrolle ohne Actinomycin D — ; mit Actinomycin D (---)

Gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte:

Werte von 9 weiblichen Wistar - Ratten.



Abb. 2: ^3H -Uridin-Einbau in Zellen eines soliden Walker-Carcinoms mit Actinomycin D ($15\mu\text{g/l}$)

a) bei mechanischer Aufarbeitung des Tumormaterials:

Kontrolle ohne Zytostatikazusatz: (—) ActD (---)

b) bei Trypsinierung:

Kontrolle ohne Zytostatikazusatz: (—) ActD-Zusatz (---)

Gesteuert durch das Mikroskopische Bild

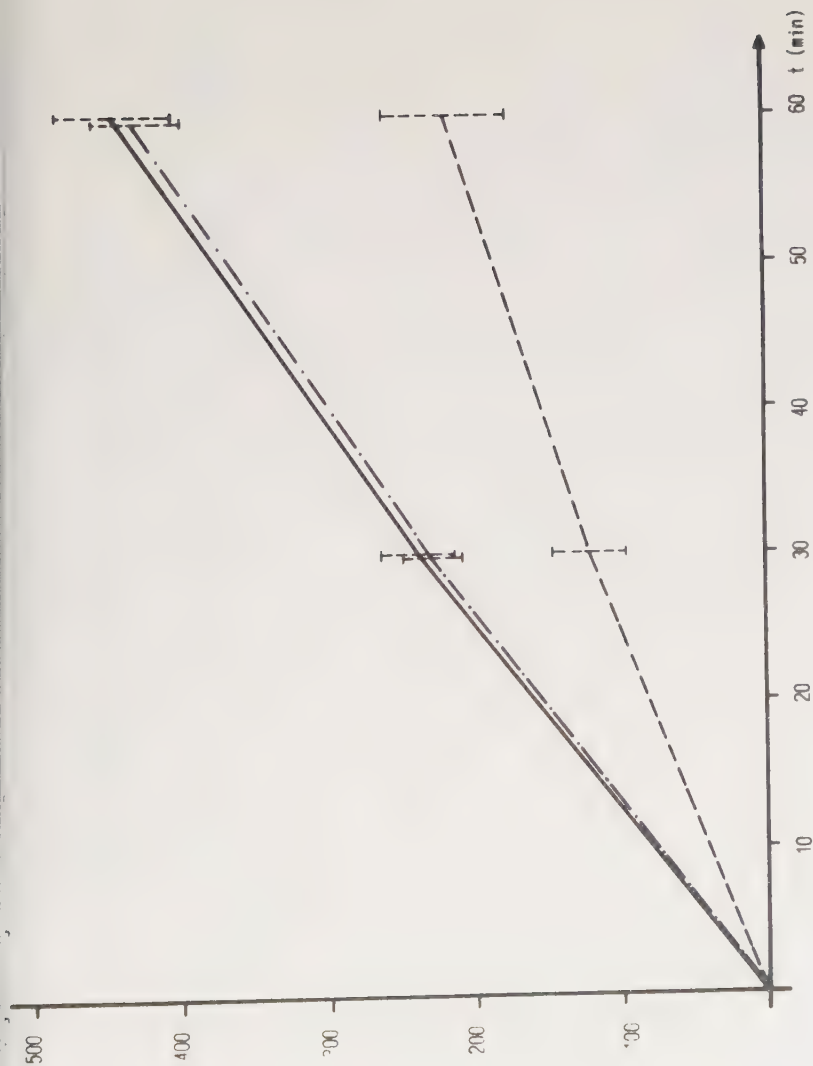


Abb. 3: ^3H -Uridin-Einbau in Ascites-Zellen eines Walker-Carcinoms in Anwesenheit von Actinomycin D (---) (15y/l) und von Vincristin (-·-) (50y/l); Kontrolle (—); gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte; Werte von 6 weiblichen Wistar-Ratten

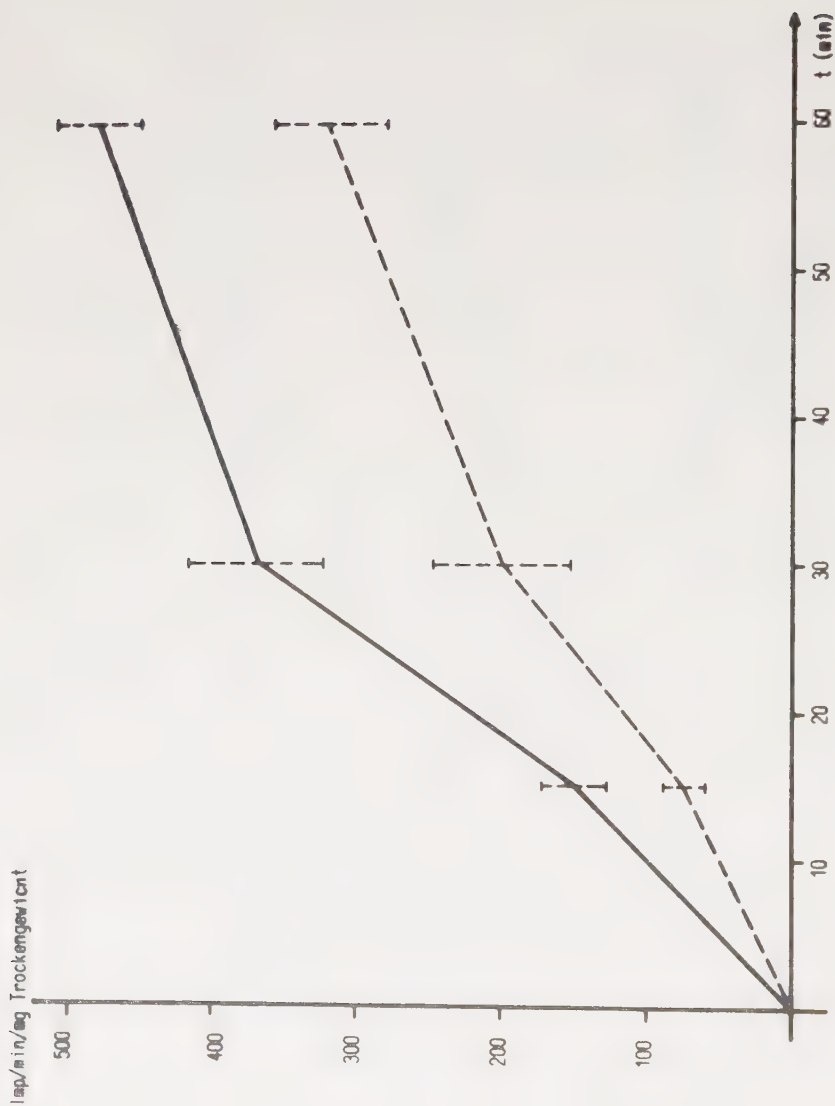


Abb. 4: ^3H -Uridin-Einbau in Zellen eines soliden Walker-Carcinoms mit Actinomycin D; Kontrolle ohne Zytostatikazusatz: (—); ActD (15 $\mu\text{g/l}$) (---); Gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte; Werte von 6 weiblichen Wistar-Ratten;

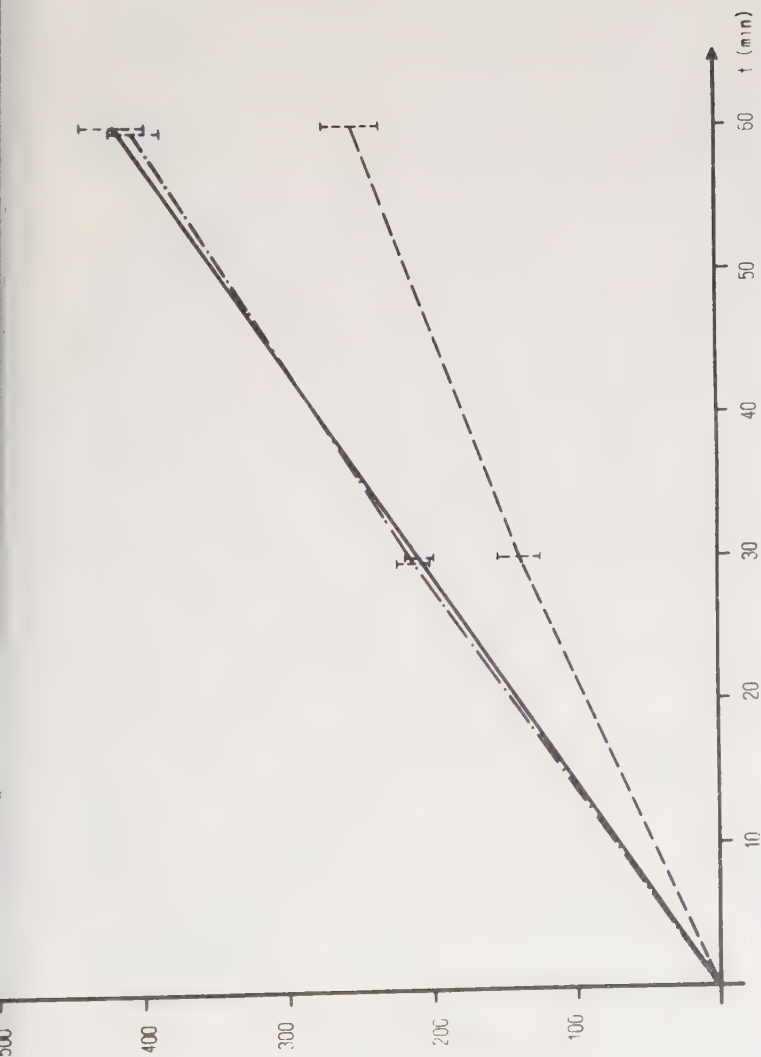


Abb. 5: ^3H -Uridin-Einbau in Ascites-Zellen eines Yoshida-Sarkoms in Anwesenheit von Actinomycin D (— · —) und Vincristin (— —); Kontrolle: (—); Gestrichelte Vertikale: Standardabweichung der Mittelwerte.
Werte von 5 weiblichen Wistar-Ratten.

Actinomycin D: 15 $\mu\text{g}/\text{l}$

Vincristin: 50 $\mu\text{g}/\text{l}$

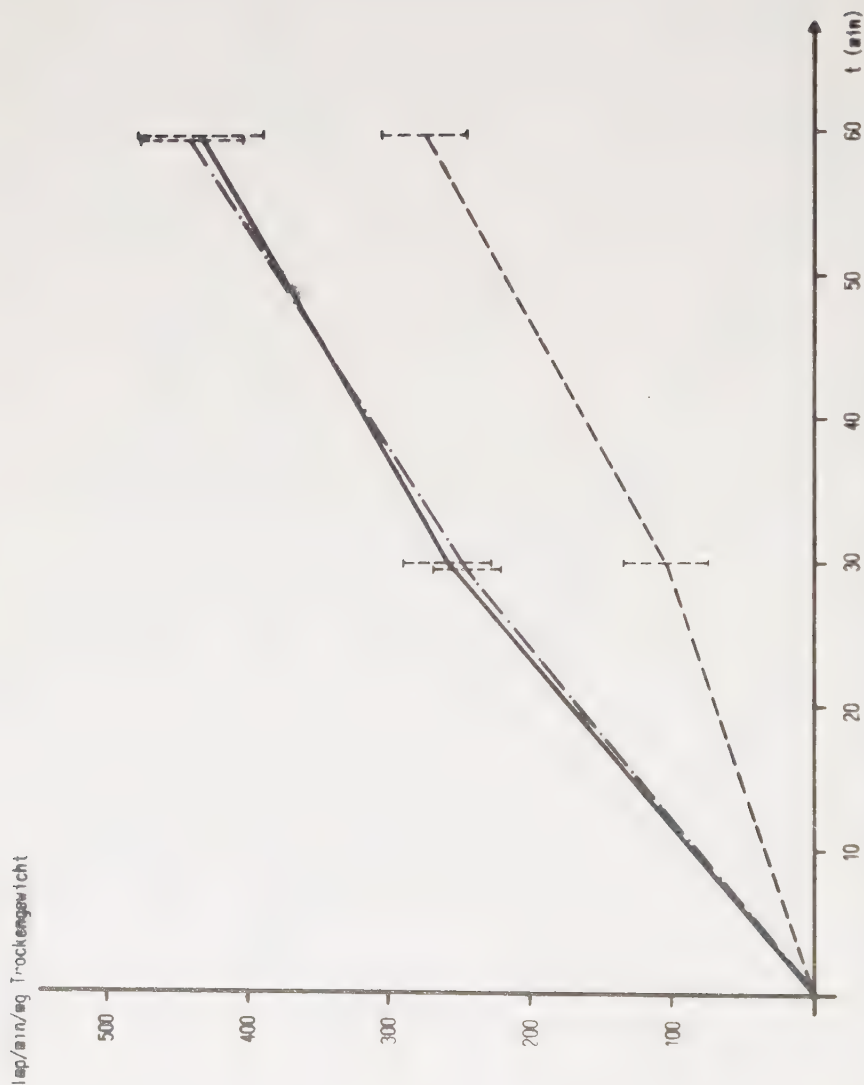


Abb. 6: ^3H -Uridin-Einbau in Zellen eines soliden Yoshida-Sarkoms in Anwesenheit von Actinomycin D (15 $\mu\text{g}/\text{l}$) (- - -) und von Vincristin (50 $\mu\text{g}/\text{l}$) (- · - · -); Kontrolle: (—);

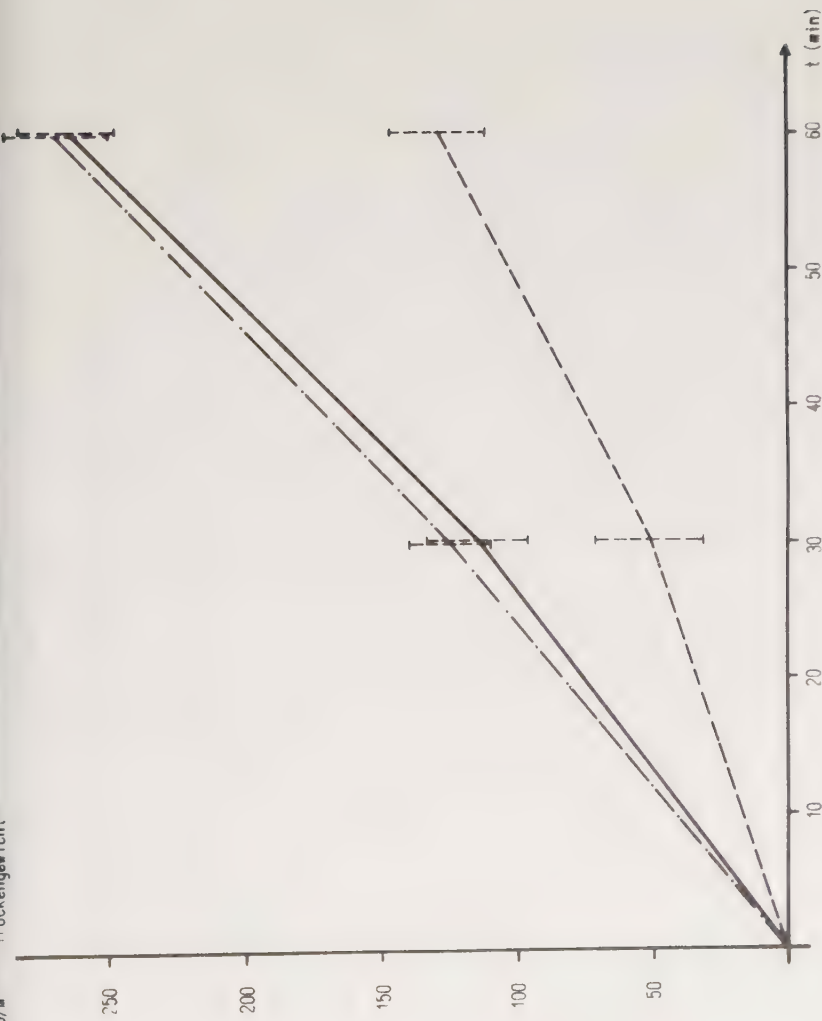


Abb. 7: ^3H - Uridin - Einbau in Zellen eines soliden Wilms - Tumors unter Einwirkung von

Actinomycin D (— · — · —) und Vincristin (— · — · —) ; Kontrolle ohne Zytostatika-

Zusatz (—) ; Mechanische Aufarbeitung des Tumormaterials:

Actinomycin D: 15 $\mu\text{g}/\text{l}$; Vincristin : 50 $\mu\text{g}/\text{l}$;

Gestrichelte Vertikale : Standardabweichung der Mittelwerte:

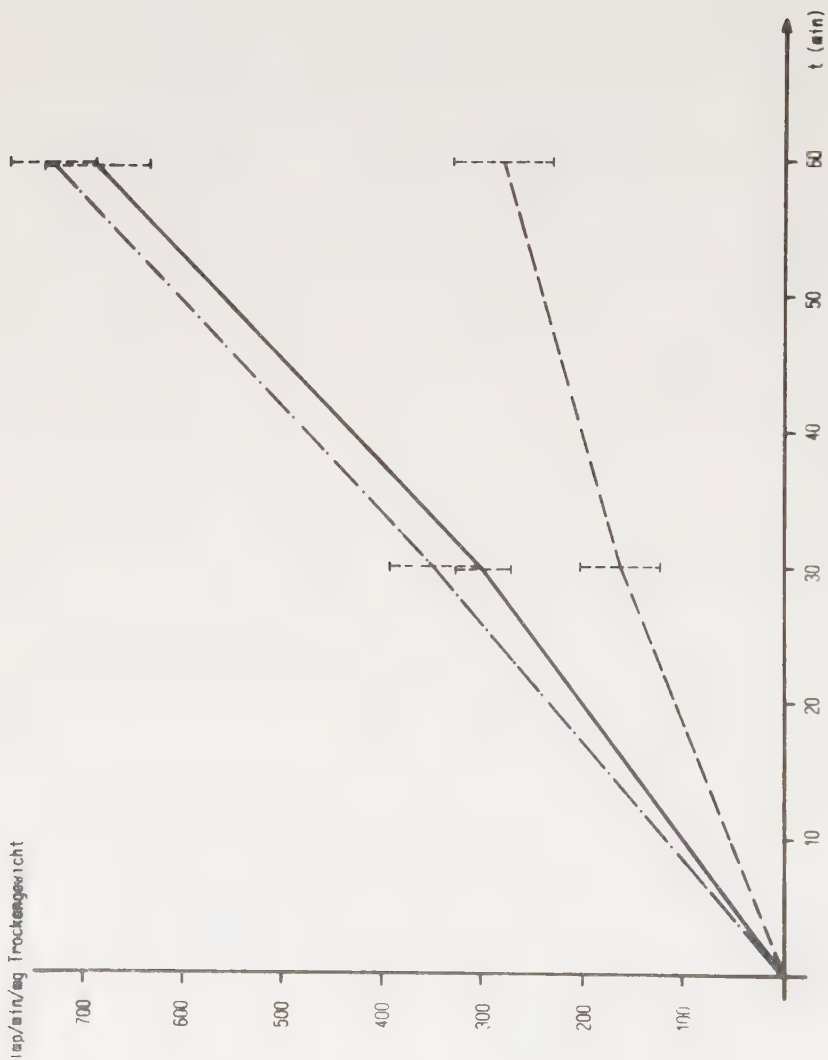


Abb. 8: ^3H -Uridin-Einbau in Zellen eines menschlichen Mamma-Carcinoms
Kontrolle: (—) unter Einwirkung von Actinomycin D (15 $\mu\text{g}/\text{l}$) (- - -)
und Vincristin (- · - · -) (50 $\mu\text{g}/\text{l}$);

Mechanische Aufarbeitung des Tumormaterials; Gestrichelte Vertikale:
Standardabweichung der Mittelwerte. Werte von 1 menschl. Tumor 10

3. BESTIMMUNG DER DAUER DES GENERATIONSZYKELS UND SEINER TEILPHASEN BEI WALKER-CARCINOMEN

3.1. EINLEITUNG

Für die Effektivität einer zytostatischen Behandlung menschlicher oder tierischer Neoplasmen sind folgende drei Voraussetzungen von wesentlicher Bedeutung:

1. die Verwendung möglichst solcher Zytostatika, die nachweislich das Wachstum des vorliegenden Tumors beeinflussen (Überprüfung z.B. durch die oben beschriebene prätherapeutische "in vitro"-Testung)

2. Kenntnisse der biologischen und biochemischen Wirkungsweisen der verwendeten Substanzen und

3. Einblick in die Proliferationskinetik der entsprechenden Tumorzellen.

Solche Einblicke in die Wachstumskinetik der verschiedensten Zellpopulationen basieren vor allem auf radiochemischen

und autoradiographischen Untersuchungen. Die Verwendung von radioaktiv markiertem Thymidin als Nukleinsäurevorstufe in Kombination mit der Technik der Autoradiographie ermöglichten es, für zahlreiche Zellpopulationen die Dauer ihrer Generationszeiten und deren Teilphasen zu bestimmen (LENNARTZ, 1964; SCHULTZE, 1968; RAJEWSKY, et al 1971; KLEIN et al, 1972).

Die genaue Kenntnis der Zellzykluszeiten eines Tumors ist deshalb von großem Nutzen, da ein Teil der verwendeten Zytostatika nur in einzelnen Teilphasen des Generationszyklus proliferationshemmend in den Tumorzellstoffwechsel eingreift (Übersicht bei MAURO und MADDOCK-JONES, 1970; RAJEWSKY, 1972; EHRHART, 1973). Bei asynchroner Vermehrung der Zellpopulation werden also nur solche Zellen durch ein Zytostatikum beeinflusst, die sich zum Zeitpunkt der Applikation bzw. solange noch ein genügend hoher Wirkspiegel des Zytostatikums im Tumor anzutreffen ist; gerade in einer für dieses Zytostatikum sensiblen Phase befinden. Gelingt es nun, eine Tumorphpopulation möglichst weitgehend zu synchronisieren, so kann man dann auf Grund der Kenntnis der zeitlichen Dauer der einzelnen Zellzyklusabschnitte eine gezielte, zellphasen-spezifische Tumorbehandlung durchführen und eine entsprechend größere Tumorzellzahl letal schädigen.

Zur Bestimmung der Generationszeit und der einzelnen Zellzyklusphasen von Walker-Carcinomen wandten wir zwei verschiedene Methoden an:

- a) die Methode markierter Mitosen (QUASTLER und SHERMAN, 1959; WIMBER und QUASTLER, 1963; HEMPEL, 1968; VINCENT et al, 1969; TERZ et al, 1971; STEEL, 1972; GILBERT, 1972) und
- b) die Doppelmarkierungsmethode mit H-3- und C-14-Thy-
midin (HILSCHER und MAURER, 1962; PILGRIM und MAURER,
1962; LENNARTZ und MAURER, 1964; LALA et al, 1965;
LENNARTZ et al, 1966; HELPAP und MAURER, 1967;
LENNARTZ et al, 1967; LORD, 1970).

3.2. MATERIAL UND METHODIK

3.2.1. BESTIMMUNG DER ZELLYKLUSZEITEN MIT DER QUASTLER-SHERMAN-METHODE

140-160 Gramm schweren weiblichen Wistar-Ratten eigener Zucht wurden 3×10^6 Ascites-Zellen eines Walker-Carcinoms am linken Oberschenkel tief intramuskulär injiziert. In 2 getrennten Versuchsreihen wurden jeweils 35 Tiere verwendet.

Bereits 6 Tage nach der Zellimplantation hatten sich bei den Versuchstieren solide Tumore entwickelt, die eine Größe von ca. 2 cm im Durchmesser aufwiesen. Die Ratten einer jeden Versuchsserie wurden von 1 - 35 durchnummeriert und gewogen. Jedem Tier wurde ^3H -Thymidin (spez. Aktivität: 5Ci/mM, Radiochemical Centre, Amersham) in einer Konzentration von 0,8 $\mu\text{Ci/g-KG}$ intraperitoneal injiziert. In stündlichen Abständen wurden die Ratten durch Nackenschlag getötet. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Tötungsreihenfolge der Markierungsreihenfolge entsprach.

Die Tumore der Tiere wurden freipräpariert und aufgeschnitten. Mit einem Skalpell wurde aus verschiedenen, periphergelegenen, makroskopisch nekrosefreien Geschwulstbereichen Gewebe entnommen und in 10%iger neutraler Formalinlösung, der inaktives Thymidin (1mg/10ml) zugesetzt war, für mehrere Tage fixiert. Nach 24stündiger Wässerung wurden die Präparate mit dem Autotechnikon in Paraffin eingebettet. Hierauf wurden mittels eines Mikrotoms (Fa. Jung) 4 μ dicke Gewebeschnitte angefertigt. Zur Entparaffinierung wurden sie für 2x20min in Xylol, 2x10min. in absoluten Alkohol und für jeweils weitere 10min in 96%igen und 70%igen Alkohol übertragen. Um die nicht eingebauten Reste des Thymidin-³H aus den Schnitten zu entfernen, wurden sie für die Dauer von 2 Stunden mit Wasser, dem inaktives Thymidin in einer Konzentration von 1mg/10ml (2-desoxy-Thymidin, Fa. Merck, Art. 8206) zugesetzt worden war, gespült.

Bei der Anfertigung der autoradiographischen Präparate wurde für die Methode der Mitosemarkierung, die Dipping-Methode und für die Doppelmarkierung die Stripping-Methode verwendet:

Dipping-Methode:

Die Objektträger wurden staubfrei getrocknet, in K2-Emulsion (1:1 verdünnt mit aqua dest., Fa. Ilford, Essex, Nuclear Research Emulsion in Gel-Form) eingetaucht und im Wasserbad auf 50°C erwärmt. Nach dem Trocknen der Emulsion wurden die Präparate für etwa 3 Wochen im Kühlschrank bei + 4°C exponiert.

Zur Ermittlung einer ausreichenden Expositionszeit wurden mehrere Probeentwicklungen durchgeführt. Die Entwicklung erfolgte mit Amidol-Entwickler (12min bei 21°C). Anschließend wurden die Präparate über 40min fixiert. Gefärbt wurden die Präparate mit Haemalaun-Eosin.

Stripping-Methode:

Nach staubfreiem Trocknen wurden die Schnitte in Chromalaungelatine eingetaucht und mit Stripping AR 10 der Fa. Kodak (Autoradiographic Stripping Plates) bedeckt. Die Präparate wurden dann für 3 Wochen bei +4°C im Kühlschrank exponiert, anschließend entwickelt und fixiert. Die Färbung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei der Dipping-Methode.

Zur Anfertigung der Prozentkurve markierter Mitosen für die vorliegenden soliden Walker-Carcinome wurden insgesamt 140 autoradiographische Präparate von 2 Versuchsserien mit je 35 Tieren ausgewertet. Pro Präparat wurden jeweils 100 Mitosen ausgezählt, wobei nur Kerne der späten Prophase (deutliche Knäulbildung der Chromatinsubstanz und Auflösung der Kernmembran) bis zur frühen Telophase berücksichtigt wurden. Um für die betrachteten Tumorzellen etwa gleiche Proliferationsbedingungen zugrundelegen zu können, wurden bei der Auszählung nur Zellen in unmittelbarer Gefäßnähe berücksichtigt (RABES, 1969).

3.2.2. BESTIMMUNG DER ZELLZYKLUSZEITEN MITTELS

DOPPELMARKIERUNG MIT ^3H - UND ^{14}C -THYMIDIN

Für die Doppelmarkierungsversuche wurden 11 weibliche, 130-160 g schwere Wistar-Ratten eigener Zucht verwendet, denen jeweils 6 Tage zuvor 3×10^6 Ascites-Zellen eines Walker-Carcinoms in den linken Oberschenkel tief intramuskulär injiziert worden waren.

Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung wiesen die Neoplasmen einen Durchmesser von jeweils 2 cm auf. In Äthernarkose wurde den Tieren das Fell im Tumorbereich mit einer elek-

trischen Schermaschine entfernt und die darunter liegende Haut mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Hierauf wurden die Tumore unter Verwendung von 5ml-Einmalspritzen mit Kanülen der Größe 1 in ihren peripheren Bereichen punktiert. Das durch mehrmalige, kurze und heftige Aspiration gewonnene Zellmaterial wurde in einer auf 37,5°C vorgewärmten Nährlösung (TCM-199: inaktives Kälberserum = 9:1) der tritiiertes Thymidin in einer Konzentration von 15µC/ml zugesetzt worden war, inkubiert.

Stärke Nachblutungen aus den Punktionskanälen traten nur selten auf.

Unmittelbar nach dieser ersten Tumorgewebseentnahme wurde den Versuchstieren ³H-Thymidin (spez.Akt. 50C/mM; Radiochemical Centre, Amersham) in einer Konzentration von 0,8µC/g-KG intraperitoneal injiziert. 30min nach dieser ³H-Pulsmarkierung wurden die Tumore erneut punktiert. Die hierbei gewonnenen Gewebepartikel wurden sofort in vorgewärmtes Nährmedium (37,5°C, TCM-199/Kälberserum = 9:1), dem ¹⁴C-Thymidin (spez.Akt. 57mC/mM; Radiochemical Centre, Amersham) in einer Konzentration von 0,08µC/ml beigegeben war, Über-

tragen. Diese Tumorteilchen konnten also in vivo ^3H -Thymidin aufnehmen, während die 30min später erfolgende ^{14}C -Thymidin-Markierung in vitro durchgeführt wurde.

Den Ratten wurde nach dieser zweiten Tumorpunktion wiederum radioaktives Material, diesmal aber ^{14}C -Thymidin ($0,08 \mu\text{C/g-KG}$), intraperitoneal injiziert. Die ^{14}C -Markierung erfolgte also 30min nach der intraperitoneal Injektion von ^3H -Thymidin.

Ebenfalls 30min nach dem ^3H -Thymidin-Zusatz erfolgte die ^{14}C -Markierung des Gewebematerials, das bei der ersten Punktion erhalten und dann in vitro mit ^3H -Thymidin markiert worden war. Hierzu wurde das ^3H -Thymidin-haltige Medium möglichst vollständig abpipettiert und durch frisches, ^{14}C -Thymidin ($0,08 \mu\text{C/ml}$) enthaltendes Medium ersetzt. 60min nach der ^3H - bzw. 30min nach der ^{14}C -Thymidin-Markierung wurden die Walker-Tumore ein drittes Mal punktiert. Das erhaltene Zellmaterial wurde ebenfalls in vorgewärmtes Nährmedium übertragen.

Unmittelbar nach der letzten Tumorpunktion wurden die Ratten durch Nackenschlag getötet und die Neoplasmen frei-

präpariert. Aus verschiedenen, peripher gelegenen, makroskopisch nekrosefreien Geschwulstbezirken wurde Gewebe entnommen und in 10%iger neutraler Formalinlösung, der inaktiver Thymidin (1mg/10ml) beigegeben war, fixiert.

Ebenfalls 30min nach Beginn der ^{14}C -Markierung wurden auch die Stoffwechselreaktionen der explantierten Tumorteilchen durch Abpipettierung des Nährmediums durch Zugabe von eiskalter Hanks-Lösung gestoppt. Hierauf wurde das Punktionsmaterial viermal mit Hanks-Lösung gewaschen und jeweils für 5min bei 1000 U/min zentrifugiert. Das gewaschene Zellmaterial der einzelnen Versuchsansätze wurde nun auf staub- und fettfreie Objektträger aufgebracht und ausgestrichen. Nach der Lufttrocknung wurden die Präparate für 24 - 48 Std. in Methanol fixiert und in entsprechender Weise, wie oben beschrieben, für die Autoradiographie nach der Dipping-Methode weiterverarbeitet.

Um beurteilen zu können, ob das bei den Punktionen gewonnene Zellmaterial bereits nekrotisch oder noch vital war, wurde jeweils eine gewisse Zellmenge mit Lissamin-Grün gefärbt. Zur Ermittlung der Lissamin-Grün-Indices

wurden pro Ansatz 1000 Zellen ausgezählt. Der Anteil an devitalisierten Zellen lag bei den rein in vitro und den kombiniert in vivo/in vitro markierten Zellansätzen, bei $3 \pm 1\%$ und bei den rein in vivo markierten Zellen bei $2,5 \pm 1\%$.

Bei der Auswertung der autoradiographischen Präparate bestimmten wir einerseits den Markierungsindex (Verhältnis der markierten Zellen zur Gesamtzellzahl) und andererseits das Verhältnis von ^{14}C -markierten Kernen (mit und ohne ^3H -Markierung) zu rein ^3H -markierten Kernen. Als markiert wurden nur solche Zellen gezählt, die mehr als 4 Silbergranula über den Kernen aufwiesen oder von denen mehr als 4 ^{14}C -Spuren ausgingen. Ausgewertet wurden autoradiographische Präparate von insgesamt 11 Versuchsreihen, die in jeweils 4 Gruppen unterteilt worden waren:

- I) rein in vitro doppelmarkiertes Punktionsmaterial,
- II) kombiniert in vivo/in vitro doppelmarkiertes Punktionsmaterial,
- III) rein in vivo doppelmarkiertes Punktionsmaterial,
- IV) in vivo doppelmarkierte Gewebsschnitte.

Zur Ermittlung des Quotienten aus ^{14}C -markierten Kernen (mit und ohne ^3H -Markierung) zu rein ^3H -markierten Kernen wurden pro Versuchsgruppe jeweils 400 markierte Zellen und zur Bestimmung des ^3H -Index jeweils 1000 Zellen ausgezählt.

3.3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zur Bestimmung der Generationszeit (T) und der Messung der Dauer der Teilabschnitte (t_{G1} , t_S , t_{G2} , t_M) des Zellzyklus bei Walker-Carcinomen wurden 2 verschiedene Wege beschritten:

- a) Ermittlung der Dauer der verschiedenen Zellzyklusphasen mit Hilfe der "Methode-markierter Mitosen" und
- b) Bestimmung der Zellzyklusphasen mit Hilfe der Doppelmarkierung ^3H - und ^{14}C -Thymidin.

Durch die Kombination dieser beiden Methoden versuchten wir zu ermitteln, ob die Dauer der Tumorgenerationszeit und deren Teilphasen unter in vivo- und unter in vitro-Verhältnissen

entsprechen. Die Methode der markierten Mitosen, die 1959 von QUASTLER und SHERMAN entwickelt wurde, basiert darauf, daß nach einmaliger i.p. Injektion von ^3H -Thymidin eine selektive Markierung derjenigen Zellkerne auftritt, die sich gerade im Stadium der DNS-Synthese befinden. Dieses Stadium wird kurz als S-Phase und ihre Dauer als t_S bezeichnet. Die S-Phase ist ein Teil des Generationszyklus, der sich folgendermaßen unterteilen läßt:

1. Mitosephase M (t_M = zeitliche Dauer der Mitosephase).
2. G_1 -Phase; sie schließt sich an die M-Phase an und wird daher als postmitotische Phase bezeichnet. Synonym wird sie auch als präsynthetische Ruhephase wegen der nachfolgenden S-Phase bezeichnet (t_{G_1} = zeitliche Dauer von G_1).
3. S-Phase (t_S = zeitliche Dauer von S).
4. G_2 -Phase; sie wird auch als postsynthetische oder wegen der darauffolgenden Mitose als prämitotische Phase bezeichnet (t_{G_2} = zeitliche Dauer von G_2).

Im Laufe der Zeit treten nach einer Pulsmarkierung mit tritiiertem Thymidin immer mehr Zellen aus der S-Phase aus und gelangen über die G_2 -Phase in die Mitosephase M. Ist der Zeitraum zwischen der 3H -Markierung und der Tötung des Tieres kleiner als t_{G_2} , so werden bei der autoradiographischen Auswertung des Zellmaterials noch keine markierten Mitosen beobachtet werden können. Erst bei der Überschreitung der Dauer von t_{G_2} werden dann die ersten markierten Mitosen auftreten. Ist das Zeitintervall zwischen der Pulsmarkierung und der Tötung der Tiere größer als t_{G_2+M} , so werden alle Mitosen radioaktiv markiert sein. Die ersten unmarkierten Mitosen treten erst wieder auf, wenn die Versuchsdauer t_{G_2+M+S} überschreitet. Läßt man zwischen der 3H -Pulsmarkierung und der Tötung der Ratten ein genügend großes Zeitintervall verstreichen, so findet sich nach dem Absinken des Prozentsatzes der markierten Mitosen ein erneuter Anstieg (QUASTLER und SHERMAN, 1959; WIMBER und QUASTLER, 1963; HEMPEL, 1968; SCHULTZ, 1968; VINCENT et al, 1969; STEEL, 1972; TERZ et al, 1971; GILBERT, 1972).

Trägt man das Verhältnis der markierten Mitosen zu der Gesamtzahl der Mitosen in Abhängigkeit von der Zeit nach ^3H -Pulsmarkierung in einer graphischen Darstellung auf, so erhält man einen wellenförmigen Kurvenverlauf mit 2 Maxima (Abb. 9). Während die mit "+" bezeichneten Punkte den tatsächlich ausgewerteten, gemittelten Prozentsätzen entsprechen, sind die mit "o" bezeichneten Punkte rein "konstruktiv" erhaltene Kurvenwerte: Jeweils 3 aufeinanderfolgende Meßpunkte ("+") wurden als Eckpunkte eines Dreiecks aufgefaßt, von dem dann der Schnittpunkt der 3 Winkelhalbierenden bestimmt wurde und als Kurvenpunkt ("o") Verwendung fand. Diese Kurvenkonstruktion ermöglichte es, starke Schwankungen der verschiedenen, aufeinanderfolgenden Meßpunkte abzugleichen.

Aus dieser Prozentkurve markierter Mitosen kann die Dauer der gesamten Generationszeit und ihrer einzelnen Teilphasen auf folgende Weise ermittelt werden:

- t_{G2} = Zeitraum zwischen der 3H -Thymidin-Injektion
(Minimum)
und dem Auftreten der ersten markierten Mitose.
- t_M = Zeitintervall des Kurvenanstiegs von 0 auf 100%.
- t_S = Zeitraum zwischen den beiden Kurvenpunkten bei
(häufigst)
denen eine 50%ige Markierung der Mitosen auf
dem ansteigenden und dem abfallenden Ast der
ersten Welle radioaktiv markierter Mitosen vor-
liegt.
- T = Zeitraum zwischen den beiden Punkten 50%iger
(häufigst)
Mitosenmarkierung der aszendierenden Schenkel
der ersten und zweiten Mitosewelle.

Aus der vorliegenden Kurve (Abb. 9), lassen sich für das
solide Walker-Carcinom folgende Werte entnehmen (Tab. 5):

$$\begin{array}{ll} t_{G2} \approx 2 \text{ Std.} & t_{G2+1/2M} \approx 3 \text{ Std.} \\ t_S \approx 9 \text{ Std.} & T \approx 19 \text{ Std.} \end{array}$$

Tab. 5: Dauer der prämitotischen Ruhephase (t_{G2}),
der prämitotischen Ruhephase + der Hälfte
der Mitosephase ($t_{G2+1/2M}$), der DNS-Synthese-
Phase (t_S) und der gesamten Generationszeit (T)
bei soliden Walker-Carcinomen, ermittelt nach
der QUASTLER-SHERMAN-Methode.

Prozent markierter Mitosen



Stunden nach H-3-Thymidin - Injektion

Abb. 9: Prozenisatz markierter Mitosen zu verschiedenen Zeiten nach einer einmaligen Injektion von H-3-Thymidin bei Walker-Karzinom.

Betrachtet man den Verlauf der Prozentkurve markierter Mitosen (Abb. 9), so fällt auf, daß einerseits der Prozentsatz der markierten Mitosen den 100%-Wert nicht erreicht, und daß andererseits sowohl der ascendierende, als auch der deszendierende Ast der ersten und insbesondere der zweiten Welle markierter Mitosen nicht linear verläuft. Dies ist vorwiegend durch Variationen der Dauer der G_2 -Phase und der M-Phase bedingt. Die Tatsache, daß der 100%-Wert der markierten Mitosen nicht erreicht wird, kann damit erklärt werden, daß Zellen mit einer kurzen Dauer von t_S , t_{G_2} und t_M die G_1 -Phase bereits zu einem Zeitpunkt erreicht haben, wo die Hauptmasse der übrigen Zellen erst zur Mitosephase gelangt ist. Die Abflachung des abfallenden Schenkels der Kurve kann neben Schwankungen von t_{G_2} und t_M Variationen der S-Phasen-Dauer zugeschrieben werden. Da zeitliche Schwankungen der einzelnen Zyklusphasen selbst bei relativ uniform erscheinenden Zellpopulationen auftreten (HEMPEL, 1966), stehen sie bei dem betrachteten Tumor, der soliden Form des Walker-Carcinoms noch mehr im Vordergrund.

Die gemessenen Generationszeiten und deren Teilphasen können nur als Durchschnittswerte der gesamten Population angesehen werden und weisen deshalb eine relativ große Variabilität bei der Dauer der einzelnen Phasen auf. Da, wie erwähnt, bei der Auszählung der Mitosen nur Zellen in unmittelbarer Gefäßnähe berücksichtigt wurden, sind die ermittelten Phasenzeiten sicherlich nicht für den gesamten Tumor repräsentativ sondern nur für einen besonders schnell proliferierenden und destruktiv-invasiv wachsenden Anteil mit besonders hoher Wachstumsfraktion (RABES, 1969).

Die Methode der Doppelmarkierung mit ^3H - und ^{14}C -Thymidin wurde erstmals von HILSCHER und MAURER (1962) angewandt. Bei diesem Verfahren wurden die Zellen zunächst mit ^3H -Thymidin und nach einem Zeitintervall Δt (30min) mit ^{14}C -Thymidin markiert. Durch Applikation von ^3H -Thymidin werden alle Zellen, die sich gerade in der S-Phase befinden, markiert. Während des Zeitintervalls Δt tritt ein Teil der ^3H -markierten Zellen in die G_2 -Phase ein.

Andererseits gelangen neue, unmarkierte Zellen in die S-Phase. Durch die Zugabe von ^{14}C -Thymidin werden nun wiederum alle S-Phasen-Zellen markiert, so daß schließlich in den Autoradiogrammen Zellen mit 3 verschiedenen Markierungen auftreten:

- a) Rein ^3H -markierte Zellen (ihre DNS-Synthese wurde zwischen den beiden Markierungen abgeschlossen),
- b) "Doppelt" mit ^3H - und ^{14}C -markierte Zellen (die S-Phase dauerte bei ^{14}C -Zusatz noch an),
- c) rein ^{14}C -markierte Zellen (sie gelangten im Zeitintervall Δt aus der G_1 -Phase in die S-Phase).

Der Zeitraum Δt zwischen den beiden Markierungszeitpunkten muß so gewählt werden, daß er kürzer ist als t_{G_2+M} , da sich markierte Kerne sonst bereits geteilt haben und bei der Auswertung dann doppelt gezählt werden (HILSCHER und MAURER, 1962; PILGRIM und MAURER, 1962; LENNARTZ und MAURER, 1964; LALA et al, 1965; LENNARTZ et al, 1966; HELPAP und MAURER, 1965; LENNARTZ et al, 1967; SCHULTZE, 1968; LORD, 1970).

Zu unterscheiden ist die ^3H - von der ^{14}C -Markierung dadurch, daß die Energie der β -Strahlen verschieden ist: Die Durchschnittsenergie Tritium-Strahlen beträgt etwa 5,5KeV und die durchschnittliche Strahlungsweite 3,5 μ . Die Silbergranula, die in den Autoradiographien durch diese Strahlung hervorgerufen werden, liegen unmittelbar über den Zellkernen. Von ^{14}C -markierten-Verbindungen ausgesandte β -Strahlen besitzen hingegen eine Durchschnittsenergie von 49,6KeV und eine Reichweite von ca. 240 μ in Wasser. Sie führen somit auch über den Kernbereich hinaus zum Auftreten von Silberkorn-Spuren (LALA et al, 1965; Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1968).

Zur Ermittlung des Quotienten aus ^{14}C -Thymidin-(mit und ohne ^3H) markierten Zellen und rein ^3H -markierten Zellen wurden, wie erwähnt, in 11 Versuchsreihen pro Ansatz jeweils 400 markierte Zellen und zur Bestimmung des ^3H -Index jeweils 1000 Zellen ausgezählt. Hierbei erhielten wir folgende Mittelwerte (Tab. 6):

Ansatz	Markierungs- index	$\frac{^{14}\text{C}-(\text{mit u. ohne } ^3\text{H})\text{mark. Zellen}}{\text{rein } ^3\text{H-mark. Zellen}}$		
I	39%	$\frac{4135}{265}$	=	15,6
II	39%	$\frac{4114}{286}$	=	14,4
III	41%	$\frac{4138}{262}$	=	15,8

Tab. 6: Markierungsindex und Quotient aus ^{14}C -(mit und ohne ^3H)markierten Zellen und rein ^3H -markierten Zellen von soliden Walker-Carcinomen bei

- I. rein in vitro doppelmarkiertem Punktionsmaterial,
- II. kombiniert in vivo/in vitro markiertem Punktionsmaterial und
- III. rein in vivo doppelmarkiertem Punktionsmaterial.

Auf die Auswertung der Autoradiographien der Gewebeschnitte mußte verzichtet werden, da durch die Vielzahl der ^{14}C -Spuren eine eindeutige Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Markierungstypen unmöglich war.

Wie aus der Tab. 6 hervorgeht, sind sowohl die Mittelwerte der Markierungsindices als auch die Mittelwerte der Quotienten aus ^{14}C -(mit u. ohne ^3H)markierten Zellen und den rein ^3H -markierten Zellen bei den einzelnen Versuchsansätzen etwa gleich groß. Man kann also annehmen, daß sich unter den gewählten Versuchsbedingungen für den Beobachtungszeitraum von einer Stunde die Proliferationskinetik der Tumorzellen nicht wesentlich von der in vitro unterscheidet. Ähnliche Ergebnisse wurden von LALA et al. (1965), PILGRIM et al. (1966), KLEIN et al. (1969), DeVITA und PERRY (1969) und VINCENT (1969) gefunden.

Die Kenntnis des zahlenmäßigen Verhältnisses der ^{14}C -(mit u. ohne ^3H) markierten Zellen zu den rein ^3H -markierten Zellen ermöglicht es, bei bekannter Dauer von $t_{\text{G2+M}}$ (sie kann aus der Kurve der markierten Mitosen entnommen werden), die Dauer des gesamten Generationszyklus T und der DNS-Phase t_{S} zu bestimmen (HILSCHER und MAURER, 1962; PILGRIM und MAURER, 1962; LENNARTZ und MAURER, 1964; LALA et al, 1965; LENNARTZ et al, 1966; HELPAU und MAURER, 1967; LENNARTZ et al, 1967; SCHULTZE, 1968; LENNARTZ et al, 1968).

Ist die Häufigkeitsverteilung der Zellen über den Generationszyklus konstant (liegt also ein steady-state-System vor), so kann die Dauer der S-Phase t_S nach der folgenden Formel berechnet werden (SCHULTZE, 1968):

$$t_S = \frac{\text{Zahl der } ^{14}\text{C-Kerne (mit und ohne } ^3\text{H})}{\text{Zahl der } ^3\text{H-Kerne}} \times \Delta t$$

Δt = Zeitintervall zwischen den beiden
Markierungen

Ein solches steady-state-System liegt z.B. bei den Kryptenepithelien des Darmes vor. Die Konstanz der Zellpopulation wird dadurch gewährleistet, daß nach einer sogenannten bivalenten Zellteilung, eine der beiden neuen Zellen auf die Zotte abwandert und sich differenziert, während die andere erneut den Zellzyklus durchläuft (LENNARTZ und MAURER, 1964).

Da bei 6 Tage alten, soliden Walker-Carcinomen in den peripheren Tumorbereichen noch ein exponentielles Wachstum angenommen werden muß, bei dem eine sogen. äquivalente Zellteilung vorliegt (nach einer Mitose können beide

Tochterzellen erneut den Generationszyklus durchlaufen), muß auch eine andere Häufigkeitsverteilung der Zellen im Mitosezyklus angenommen werden.

Während bei einer steady-state-Population die Anzahl der Zellen in einer Teilphase des Generationszyklus der zeitlichen Dauer dieser Phase proportional ist und somit, unter der Voraussetzung, daß sich alle Zellen der Population im Mitosezyklus befinden und die growth-fraction 1,0 beträgt, folgende Beziehung vorliegt

$$dz = \frac{Z_0}{T} d\theta \quad (I)$$

Z_0 = Gesamtzellzahl der Population;

T = Dauer des Generationszyklus;

θ = Alter der Zelle im Zyklus, z.B. $\theta = 0$ = Beginn der G_1 -Phase, $\theta = T$ = Dauer des gesamten Zyklus bis zum Ende der M-Phase;

dz = Zellzahl innerhalb des Zellzyklusintervalls $d\theta$;

gilt für eine exponentiell wachsende Population eine andere Häufigkeitsverteilungsfunktion. Diese wurde in einem analytischen Verfahren von LENNARTZ et al. (1968) angegeben.

Hier sollen die wesentlichen Schritte angeführt werden.

Durch die äquivalente Zellteilung nimmt die Zelldichte

$\frac{dz}{d\theta}$ vom Beginn der G_1 -Phase ($\theta = 0$) bis zum Ende der Mitosephase ($\theta = M$) exponentiell um den Faktor 2 ab.

Die Häufigkeitsverteilung der Zellen innerhalb des Generationszyklus gehorcht nunmehr folgender Differentialgleichung:

$$dz = Z_0 \times 2^{\frac{(1-\theta)}{T}} \times \frac{\ln 2}{T} \times d\theta \quad (II)$$

Setzt man nun, basierend auf den Ergebnissen von LENNARTZ, MAURER und EDER (1968), die Gesamtzellzahl Z_0 gleich 1 und integriert die Häufigkeitsfunktion (II), so kann man den Bruchteil der Zellen in jedem beliebigen Zyklusintervall bestimmen:

$$\begin{aligned} \int_{\theta = -\Delta T}^{\theta} dz &= \int_{\theta = -\Delta T}^{\theta} 2^{\frac{(1-\theta)}{T}} \times \frac{\ln 2}{T} \times d\theta = 2 \times 2^{\frac{-\theta}{T} \left(2^{\frac{\Delta T}{T}} - 1 \right)} = \\ &= 2 \times 2^{\frac{-\theta}{T}} \left(e^{\frac{\ln 2 \times \Delta T}{T}} - 1 \right) \end{aligned}$$

Ist die Dauer von t_{G2+M} bekannt, so kann man nun nach Ausdruck II folgenden rechnerischen Ansatz zur Bestimmung des Markierungsindex (MI) geben:

$$\begin{aligned} \text{MI} &= \frac{2 \times 2^{-\frac{T-(G2+M)}{T}} \frac{S}{2T} (2T - 1)}{1} & (\text{III}) \\ &= 2 \frac{\frac{(G2+M)}{T}}{(2T - 1)} \frac{S}{2T} \end{aligned}$$

Nimmt man an, daß die relative Häufigkeit der markierten Kerne (MI) gleich dem Integral über die Funktion II vom Beginn der S-Phase bis zu ihrem Ende geteilt durch das Integral in den Grenzen von $\theta = 0$ bis $\theta = T$ (also vom Beginn der G_1 -Phase bis zum Ende der M-Phase) ist, so gilt zur Berechnung des MI obiger Ansatz (III).

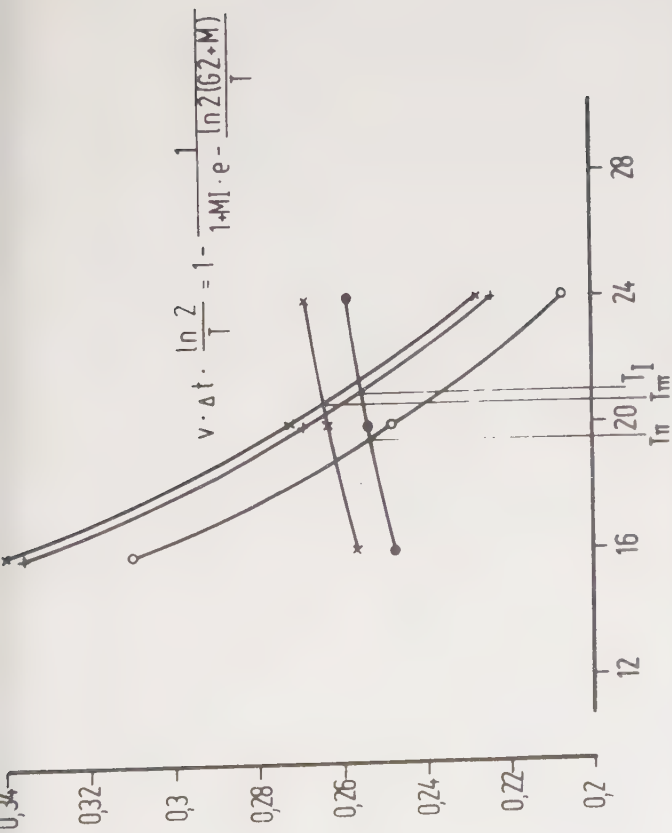
Auf die gleiche Weise kann nun auch die relative Häufigkeit der rein ^3H - und aller ^{14}C - (mit und ohne ^3H) markierten Kerne berechnet und ins Verhältnis gesetzt werden. Die entsprechenden Berechnungen wurden bereits von LENNARTZ, MAURER und EDER 1968 durchgeführt und ermöglichten ihnen auch die Generationszeit T und die Dauer der DNS-Synthesephase t_S aus dem Häufigkeitsverhältnis v der unterschied-

lich markierten Zellen und dem Markierungsindex (MI), bei bekannter Zeitdauer t_{G2+M} zu bestimmen. Sie leiteten hierzu folgende Ausdrücke ab:

$$v \times t \times \frac{\ln 2}{T} = 1 - \frac{1}{1 + MI \times e^{\frac{-\ln 2 (G2+M)}{T}}} \quad (IV)$$

$$S = \frac{T}{\ln 2} \times \ln \left(1 + MI \times e^{\frac{-\ln 2 (G2+M)}{T}} \right) \quad (V)$$

Setzt man in die Gleichung (IV) die Ergebnisse der Tab. 6 ein (Markierungsindex und Quotient aus ^{14}C - (mit und ohne 3H) markierten Zellen und rein 3H -markierten Zellen von soliden Walker-Carcinomen bei I. rein in vitro doppelmarkiertem Punktionsmaterial, II. kombiniert in vivo / in vitro doppelmarkiertem Punktionsmaterial und III. rein in vivo doppelmarkiertem Punktionsmaterial) so erhält man bei der grafischen Lösung dieser Gleichung für Walker-Carcinome eine Generationszeit zwischen 19,5 und 21 Stunden (Abb. 10).



AB3. 10: BESTIMMUNG DER GENERATIONSZEIT T VON WALKER-CARCINOMEN MITTELS
 GRAPHISCHER LÖSUNG DER GLEICHUNG IV (NACH LENNARTZ, 1968),
 $T_I = 21$ STD. (GENERATIONSZEIT BEI REINER IN VITRO DOPPEL-
 MARKIERUNG)

$T_{II} = 19,5$ STD. (GENERATIONSZEIT BEI KOMBINIERTER IN VIVO/
 IN VITRO DOPPELMARKIERUNG)

$T_{III} = 20,6$ STD. (GENERATIONSZEIT BEI REINEK IN VIVO DOPPEL-
 MARKIERUNG)

Damit stimmt die nach dem graphischen Verfahren (LENNARTZ, MAURER und EDER, 1968) ermittelte Generationszeit T sehr genau mit dem aus der Prozentkurve markierter Mitosen ermittelten Ergebnis (Tab. 5) überein. Da uns das graphische Verfahren allerdings relativ langwierig erschien, versuchten wir die Gleichung IV numerisch zu lösen.

Die Unbekannte T, die auf der rechten Seite der Gleichung IV als Exponent im Subtrahenden auftritt, läßt es nicht zu, daß diese Gleichung durch Anwenden des Logarithmus-Kalküls nach T aufgelöst werden kann. Man ist deshalb auf Näherungsverfahren angewiesen. Zur Anwendung eines hierzu notwendigen Iterationsverfahrens muß die Gleichung IV umgeformt werden:

$$v \times \frac{\Delta t \times \ln 2}{T} = 1 - \frac{1}{1 + MI \times 2^{-\frac{(G2+M)}{T}}}$$

$$\frac{T}{v \times \Delta t \ln 2} = \frac{1}{MI \times 2^{-\frac{(G2+M)}{T}}} + 1$$

$$T = \frac{v \times \Delta t \times \ln 2}{MI} \times 2^{\frac{(G2+M)}{T}} + v \times \Delta t \times \ln 2 \quad (VI)$$

Diese Gleichung legt die Iteration nach Newton
(HÄMMERLIN, 1969) nahe.

Neueingeführte Abkürzung:

$$a = v \times \Delta t$$

Mit dieser Abkürzung nimmt die Gleichung VI folgende
Gestalt an:

$$T = \frac{a \times \ln 2}{M I} \times 2^{\frac{G2+M}{T}} + a \times \ln 2 \quad (\text{VII})$$

Weiteres Vorgehen:

(+) 1. Man bestimmt einen ersten Näherungswert für T
= : $T^{(0)}$ (zur Bestimmung dieses Näherungswertes
siehe die folgenden Seiten)

2. Man iteriert

$$T^{(1)} = \frac{a \times \ln 2}{M I} \times 2^{\frac{G2+M}{T^{(0)}}} + a \times \ln 2$$

$$T^{(2)} = \frac{a \times \ln 2}{M I} \times 2^{\frac{G2+M}{T^{(1)}}} + a \times \ln 2$$

·
·
·
·
·

Falls die so erhaltenen schrittweisen Näherungen in mehr
Dezimalstellten übereinstimmen, liegt eine Konvergenz der
Iteration vor.

Auf diese Weise läßt sich die Genauigkeit der Näherung beliebig verfeinern. Eine Modifikation dieser Iteration stellt das Verfahren nach Newton - Raphson (HÄMMERLIN, 1969) dar:

Allgemeiner Ansatz:

Gesucht T so daß $f(T) = 0$,

Newton - Raphson:

$$T^{(i+1)} = T^{(i)} - \frac{f(T^{(i)})}{\frac{f}{T}(T^{(i)})}$$

Anwendung:

$$f(T) = \frac{a \times \ln 2}{MI} \times 2^{\frac{G2+M}{T}} - T + a \times \ln 2$$

Iterationsvorschrift:

$$T^{(i+1)} = \frac{a \times \ln 2 \cdot 2^{\frac{G2+M}{T^{(i)}}} + (T^{(i)})^2 \cdot \frac{G2+M}{2T^{(i)}} + MI \times (T^{(i)})^2}{a \times G2 + M \times (\ln 2)^2 \times 2^{\frac{G2+M}{T^{(i)}}} + MI \times (T^{(i)})^2}$$

$i = 0, 1, 2 \dots$

Dieses Verfahren beruht auf dem gleichen Prinzip wie das einfache Newton-Verfahren, konvergiert jedoch wesentlich schneller als dieses.

Die Schnelligkeit der Konvergenz hängt wesentlich von der Güte des Startwertes (= erster Näherungswert) ab. Dieser muß vor Beginn der Iteration bestimmt werden (siehe (+)).

Zur Bestimmung des Startwertes seien folgende durch Taylor-Entwicklung (HÄMMERLIN, 1969) gewonnenen Näherungsformeln angeführt:

Taylor-Entwicklung:

$$f(x) = f(x_0) + f'(x_0) \times x - x_0 + \frac{f''(x_0)}{2!} (x - x_0)^2 + \\ + \frac{f'''(x_0)}{3!} \times (x - x_0)^3 + \dots$$

$$n! = 1 \times 2 \times 3 \dots n$$

Faustformel:

$$T \approx a \times (\ln 2) \times \left(1 + \frac{1}{MI}\right)$$

Bricht man die Taylor-Entwicklung erst nach dem 2. Glied ab, so wird natürlich die Genauigkeit größer (als bei der Faustformel). Man erhält jedoch eine quadratische Gleichung, die im allgemeinen 2 Lösungen besitzt:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{2 \times MI} \left[\frac{MI \times (G2+M) + a \times MI + a \pm \sqrt{[MI \times (G2+M) + a \times MI + a]^2 - 4a \times (MI)^2 \times (G2+M)}}{2} \right] \quad (VIII)$$

Mit dem so berechneten Wert für T läßt sich nun auch t_S nach der Gleichung V berechnen.

Angewendet auf unsere Versuchsergebnisse finden sich für die Dauer der Generationszyklus T ($=t_G$) und der Teilphase t_S folgende Werte (Tab. 7):

Ansatz	Generationszeit T	S-Phasen-Dauer t_S
I	21,0Std. (21,0Std.)	8,9 Std.
II	19,8Std. (19,5Std.)	8,2 Std.
III	20,6Std. (20,6Std.)	9,2 Std.

Tab. 7: Dauer der Generationszeit T und der DNS-Synthesephase t_S bei der Annahme exponentiellen Wachstums solider Walker-Carcinome:

- I) bei reiner in vitro Doppelmarkierung,
- II) bei kombinierter in vivo/in vitro Doppelmarkierung,
- III) bei reiner in vivo Doppelmarkierung.

Die mit dem graphischen Verfahren erhaltenen Ergebnisse sind in Klammern angegeben.

Die unter der Annahme exponentiellen Wachstums errechneten Werte für die Generationszeit T und der Dauer der DNS-Synthese-Phase t_S bei reiner in vitro Doppelmarkierung, kombinierter in vivo/in vitro Markierung und reiner in vivo Doppelmarkierung sind praktisch identisch. Man kann dann also annehmen, daß sich die Wachstumskinetik der Zellen in vitro unter den gewählten Versuchsbedingungen und in dem untersuchten Zeitraum von einer Stunde nicht von der in vivo unterscheidet. Diese Annahme wird auch durch die sehr gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Prozentkurve markierter Mitosen (Tab. 5) gestützt. Aufgrund des wesentlich geringeren Versuchsaufwandes und des rascheren Erhaltens von Ergebnissen scheint es allerdings günstiger zu sein, der Methode der Doppelmarkierung von Punktionsmaterial den Vorzug gegenüber der Methode der markierten Mitosen zu geben. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß auch die Generationszeit und die DNS-Synthese-Phasen-Dauer menschlicher Neoplasmen durch in vitro Doppelmarkierung von Tumorpunktionsmaterial bestimmt werden kann, wodurch dann bei einer teilsynchronisierten Geschwulstpopulation ein gezielter Einsatz phasenspezifischer Zytostatika ermöglicht wird.

Anmerkung:

Bei den vorliegenden Versuchen zur Bestimmung der Generationszeit und der Dauer der einzelnen Teilphasen des Walker-Carcinoms wurde angenommen, daß sich alle Zellen im Mitosezyklus befinden und die "growth-fraction" 1,0 beträgt. Da aber keine Bestimmung der tatsächlichen Wachstumsfraktion durchgeführt wurde, können die ermittelten Werte daher keinen absoluten Genauigkeitsanspruch auf die tatsächliche zeitliche Dauer der einzelnen Phasen erheben.

4. SYNCHRONISATION VON WALKER-CARCINOMEN DURCH IN VIVO APPLIKATION VON 5-FLUORURACIL (FU)

4.1. EINLEITUNG

Bei der Durchführung einer zytostatischen Therapie ist eine größere Effektivität zu erwarten, wenn es gelingt, eine Tumorphopulation möglichst weitgehend zu synchronisieren und dann, bei Kenntnis der Dauer der einzelnen Zyklusabschnitte, eine gezielte, zellphasen-spezifische Tumorbehandlung durchzuführen. Die Annahme, daß die Generationszeiten und deren Teilphasen bei einer randomisierten und bei einer synchronisierten Population einander entsprechen, wurde 1963 von TERASIMA und TOLMACH bestätigt.

Zur Synchronisation einer Zellpopulation bieten sich sowohl physikalische, als auch chemische Methoden an. Die chemischen Verfahren lassen sich wiederum in zwei Hauptgruppen unterteilen:

- a) phasenspezifische, zeitlich begrenzte Blockierung proliferierender Zellen, einhergehend mit einer Zellanhäufung vor der blockierten Phase und einem gemein-

sam einsetzenden wellenförmigen Fortschreiten durch den Mitosezyklus bei Beendigung der Blockade (McALLISTER u.a., 1959; LITTLEFIELD, 1962; GALAVAZI und BOOTSMA, 1966; GALAVAZI u.a., 1966; KIM u.a., 1967; PFEIFFER und TOLMACH, 1967; SEDGLEY und STONE, 1969; KLEIN u.a., 1970; KUROKI und SATO, 1970; VILLADSEN und ZEUTHEN, 1970; RAJEWSKY u.a. 1971; GANZER u.a., 1972; KLEIN u.a., 1972; NITZE u.a., 1972; RAJEWSKY u.a., 1972) und

b) Selektionierung von Zellen einer bestimmten Phase durch Anwendung der sogenannten "Fenster-Technik".
Beispiel: Einer asynchron wachsenden, randomisierten Zellpopulation wird eine Substanz zugesetzt, die selektiv Zellen, die sich in der S-Phase befinden, zerstört. Wirkt diese Substanz genügend lange auf die Zellen ein, so werden schließlich nur noch Zellen der G_1 -Phase vorhanden sein, da aus der S-Phase keine vitalen Zellen mehr in die G_2 -Phase gelangen können und die zum Zeitpunkt der Substanzzugabe in G_2 und M befindlichen Zellen nun nach G_1 fortgeschritten sind (NIAS und FOX, 1971).

Von den physikalischen Methoden zur Erzielung einer synchronisierten Zellpopulation stellt das "Abernten" von Mitosen asynchron wachsender Monolayer-Kulturen zweifelsohne eine der elegantesten Techniken dar (TERA-SIMA und TOLMACH, 1963). Nachteil dieser Methode sind die alleinige Verwendbarkeit für in vitro Versuche und die geringe Zellausbeute, die allerdings durch Colcemid-Applikation vergrößert werden kann (STUBBLEFIELD und KLEVECZ, 1965; ROMSDAHL, 1967). Auch die Anwendung von Hitze- oder Kälteschocks (NEWTON und WILDY, 1959; MARTIN und SCHLOERB, 1964; RAD und ENGELBERG, 1965; SISKEN u.a., 1965; ZEUTHEN, 1970; TORRE, de la, u.a., 1971), die Volumen-bedingte Selektion und die Gradienten-Technik gehören zur Gruppe der physikalischen Methoden.

Bei der Gradienten-Technik können Zellen einer bestimmten Phase auf Grund ihres Volumens und ihrer Dichte durch Zentrifugation und Sedimentation in 10-30%iger Saccharose- oder 5-20%iger Ficoll-Lösung von den übrigen Zellen abgetrennt werden (Übersicht bei NIAS und FOX, 1971).

Während die bisher erwähnten Methoden hauptsächlich zur Synchronisation von Zellpopulationen in vitro benutzt werden, finden chemische Techniken sowohl bei in vitro - als auch bei in vivo Versuchen gleichermaßen Verwendung. Die sogen. Blockade-Methoden stehen hierbei gegenüber den erwähnten Fenster-Techniken ganz im Vordergrund. Bei den Blockade-Methoden werden hauptsächlich folgende Substanzen verwendet:

a) Thymidin: Im Überschuß gegeben führt es zu einer Blockierung bzw. starken Verzögerung der ZellprogreSSION durch die DNS-Synthese-Phase (GALAVAZI und BOOTSMA, 1966; GALAVAZI u.a., 1966; KUROKI und SATO, 1970; VILLADSEN und ZEUTHEN, 1970),

b) Vincristin- und Vinblastin-Sulfat:

Bei entsprechender Dosierung führen diese Substanzen durch Beeinflussung der mitotischen Spindelformationen zu einer reversiblen Arretierung in der Metaphase (SEDGLEY und STONE, 1969; KLEIN u.a., 1970; KLEIN u.a., 1972),

c) Hydroxyharnstoff:

Die Substanz verhindert die enzymatische Reduktion von Purin- und Pyrimidin-Ribonukleotiden zu den Desoxyribonukleotiden und blockiert dadurch spezifisch die DNS-Synthesephase (KIM u.a., 1967; PFEIFFER und TOLMACH, 1967; RAJEWSKY u.a., 1971; RAJEWSKY u.a., 1972);

d) 5-Fluorouracil (FU) oder 5-Fluoro-2'-desoxyuridin:

Die Substanzen hemmen die Zellprogression durch S-Phase: Durch Blockierung der Thymidylat-Synthetase wird die Transmethylierung von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) zu Thymidinmonophosphat (TMP) unterbunden. Die Blockade kann durch Applikation von Thymidin (TdR) aufgehoben werden (McALLISTER u.a., 1959, LITTLEFIELD, 1962; GANZER u.a., 1972; NITZE u.a., 1972).

Zur in vivo Synchronisation von Walker-Carcinomzellen verwendeten wir 5-Fluorouracil (Fluor-uracil, Roche, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach, Baden).

Intravenös verabreicht wird FU zum größten Teil in der Leber katabolisiert und in Form harmloser Abbauprodukte ausgeschieden: Etwa 80% der injizierten Menge werden als CO_2 über die Lunge abgeatmet und ca. 15% als Harnstoff und α -Fluoro- β -alanin im Urin ausgeschieden. Nur ein kleiner Bruchteil wird zu 5-Fluoro-2'-desoxyuridin-monophosphat (FUDRMP), dem Hemmstoff der Thymidylat-Synthetase, ana-bolisiert (HEIDELBERGER u.a., 1957; HEIDELBERGER, 1958; CHAUDHURI u.a., 1958; DANNEBERG u.a., 1958; BOSCH u.a. 1958; CURRERI u.a., 1958; EIDINOFF und RICH, 1959; BURCHENAL u.a., 1959; HÄGGMARK, 1962; HEIDELBERGER u.a., 1963; SEIDEL und WEGENER, 1969; HITCHINGS und ELION, 1972; BRINKMANN und DÖRMER, 1972; DÖRMER u.a. 1972).

4.2. MATERIAL UND METHODIK

180-210 Gramm schwere weiblichen Wistar-Ratten eigener Zucht, die mit Altromin-Standarddiät und Wasser ad libitum ernährt wurden, wurden jeweils 3×10^6 Ascites-Zellen eines Walker-Carcinoms in den linken Oberschenkel intramuskulär injiziert.

6 Tage später, zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns, fanden sich bei den Tieren solide Tumore von etwa 2cm im Durchmesser. Nachdem mit einer elektrischen Schermaschine das Fell im Bereich der Schwanzwurzel abgetragen worden war, wurden die Ratten in Einzelkäfige gesetzt, die an ihrer Rückwand Öffnungen aufwiesen, durch die die Schwänze der Tiere nach außen durchgezogen und fixiert werden konnten. Nahe der Schwanzwurzel eines jeden Tieres wurde eine Schwanzvene aufgesucht und eine "Schwabinger-Kanüle" eingeführt. Die richtige Lage der Nadel wurde geprüft:

a) durch leichte Blutaspiration und b) durch Injektion von 1ml 0,89%iger Kochsalzlösung unter Berücksichtigung von Volumenveränderungen des Schwanzes.

Die Kanülen wurden dann über Schlauchsysteme mit "Luer-Lok"-Spritzen, die auf einem Infusionsgerät (Perfusor, Braun, Melsungen) befestigt worden waren, verbunden.

Insgesamt wurden 8 Tiere verwendet. Jedem Tier wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden 20ml Flüssigkeit infundiert: Alle 4 Infusionsansätze enthielten neben isotoner Kochsalzlösung tritiiertes Desoxycytidin (spez. Akt. 21, 20/mM; Radiochemical Centre, Amersham) zur Markierung DVS-syntheti-

sierender Zellen; 2 Ansätzen wurde zusätzlich FU beigegeben. Die applizierten Dosen an Desoxycytidin und 5-Fluoro-uracil waren vom jeweiligen Körpergewicht der Tiere abhängig und beliefen sich bei H-3-CdR auf $4\mu\text{C/g-KG}$ und bei FU auf 15mg/kg-KG .

Nach 24stündiger Infusion wurden 2 Ratten durch Nackenschlag getötet. Ausgewählt wurde hierfür jeweils ein mit und ein ohne 5-Fluoro-uracil infundiertes Tier.

Die beiden anderen Ratten wurden für weitere 9 Stunden infundiert und zwar mit isotoner Kochsalzlösung, tritiiertem Desoxycytidin ($4\mu\text{C/g-KG}$) und nicht-radioaktivem Thymidin ($2,5\mu\text{g/g-KG}$). Anschließend wurden auch sie getötet. Die Tumore der einzelnen Tiere wurden freipräpariert und aufgeschnitten. Aus peripher gelegenen makroskopisch nekrosefreien Geschwulstbezirken wurden mehrere Gewebeproben entnommen, homogenisiert und der DNS-Extraktion nach der Methode von MUNRO und FLECK unterzogen. Der DNS-Gehalt der einzelnen Proben konnte durch die Diphenylamin-Farbreaktion nach BURTON ermittelt werden. Die Radioaktivität des in die DNS eingebauten tritiierten Desoxycytidin wurde mit Hilfe des Flüssigkeitsszintillationsspektrometers (Packard Tricarb 3214) gemessen.

4.3. ERGEBNISSE

Bezieht man die mit dem Flüssigkeitsszintillations-spektrometer gemessenen Impulszahlen, auf die jeweilige DNS-Menge (mg-DNS) so erhält man die "spezifische Aktivität" der DNS. Bei den vorliegenden Versuchsansätzen erhielten wir folgende Ergebnisse (Tab. 5):

Ansatz	Infusion	Dauer (Stunden)	spez. Akt. der DNS (cpm/mg-DNS)
I	NaCl, ^3H -CdR	24	40.886
II	NaCl, ^3H -CdR, FU	24	40.526
III	NaCl, ^3H -CdR	24	55.568
	NaCl, ^3H -CdR, TdR	9	
IV	NaCl, ^3H -CdR, FU	24	92.998
	NaCl, ^3H -CdR, TdR	9	

Tab. 5: Spezifische Aktivität der DNS (cpm/mg-DNS) von Walker-Carcinom-Zellen nach

- (I) 24stündiger Infusion mit ^3H -CdR ($4\mu\text{C/g-KG}$) und NaCl (0,89%)
- (II) 24stündige Infusion mit ^3H -CdR ($4\mu\text{C/g-KG}$), FU (15mg/kg-KG) und NaCl (0,89%)
- (III) 24stündiger Infusion mit ^3H -CdR ($4\mu\text{C/g-KG}$) und NaCl (0,89%) und zusätzlicher 9stündiger Infusion mit ^3H -CdR ($4\mu\text{C/g-KG}$), nicht radioaktivem TdR ($2,5\mu\text{g/g-KG}$) und NaCl (0,89%)
- (IV) 24stündiger Infusion mit ^3H -CdR ($4\mu\text{C/g-KG}$) FU (15mg/kg-KG) und NaCl (0,89%) und anschließender 9stündiger Infusion mit ^3H -CdR ($4\mu\text{C/g-KG}$), nicht-radioaktivem TdR ($2,5\mu\text{g/g-KG}$) und NaCl (0,89%)

4.4. DISKUSSION

Da fast alle Säugerzellen Thymidinmonophosphat auf 2 verschiedenen Wegen bilden können (ADELSTEIN u.a., 1964) und zwar einerseits durch Methylierung von Desoxyuridinmonophosphat (= de novo Synthese) und andererseits durch Phosphorylierung von Thymidin (= salvage pathway), wird durch Applikation von FU lediglich die de novo Synthese von Thymidinmonophosphat (TMP) blockiert, während der salvage pathway durch die Verarmung der Zellen an Thymidintriphosphat (TTP) und der damit einhergehenden Aktivitätssteigerung der Thymidinkinase sogar stimuliert wird (EIDINOFF und RICH, 1959; HÄGGMARK, 1962; HEIDELBERGER u.a., 1963; SEIDEL und WEGENER, 1969; HITCHINGS und ELION, 1972; BRINKMANN und DÖRMER, 1972; DÖRMER u.a., 1972). Ist das die Zellen umgebende Milieu reich an Thymidin, so kann über den salvage pathway den Zellen soviel TMP zur Verfügung gestellt werden, daß trotz Blockade der de novo Synthese durch FU, die DNS-Synthese mit normaler Geschwindigkeit ablaufen kann und somit keine Verzögerung der Zellprogression durch die

S-Phase auftritt. Ist allerdings das umgebende Milieu arm an Thymidin, so kann das über den "salvage pathway" gebildete TMP den Bedarf nicht decken und es kommt zu einer Blockierung der DNS-Synthese. Gelingt es, den Block genügend lange aufrecht zu erhalten, so werden schließlich vermehrt Zellen in der G_1 -Phase bzw. unmittelbar vor dem Beginn der S-Phase anzutreffen sein. Hebt man nun die Blockade durch Thymidin-Zusatz auf, so kann auch unter "Idealbedingungen" niemals eine totale, sondern lediglich eine partielle Synchronisation erzielt werden: wird nämlich die Blockade aufgehoben, so werden zwar alle die Zellen, die zuvor am Ende der G_1 -Phase gestopt worden waren, gleichzeitig mit der DNS-Synthese beginnen und schließlich auch synchron in die Mitosephase eintreten, die Zellen jedoch, die in verschiedenen Positionen innerhalb der S-Phase blockiert wurden, werden mit ihrer DNS-Synthese fortfahren und auf Grund ihrer Lage im Zellzyklus die Mitosephase rascher erreichen.

Um zu erfahren, ob bei unseren Versuchen eine Teilsynchronisation der Walker-Carcinom-Zellen erreicht werden konnte, ermittelten wir jeweils die spezifische Aktivität

der DNS nach Gabe von radioaktivem CdR. Die hier ermittelten Werte allerdings können wegen der geringen Versuchstierzahl nur mögliche Tendenzen aufzeigen: Vergleicht man die Ergebnisse der Ansätze I (40.886 cpm/mg-DNS) und II (40.526 cpm/mg-DNS) miteinander, so kann die etwa gleiche spez. Aktivität als Anzeichen für eine nahezu gleich hohe DNS-Synthese-Rate betrachtet werden. Da nun beim Ansatz II die de novo Synthese von TMP durch FU gehemmt wurde, muß eine starke Stimulierung des salvage pathways vorliegen. Betrachtet man die ermittelten Zahlenwerte der Ansätze I (40.866 cpm/mg-DNS) und III (55.568 cpm/mg-DNS), so ist die höhere Einhaureate von tritiiertem Material pro mgDNS in Ansatz III leicht durch die längere Aufnahmemöglichkeit (insgesamt 33stündige ³H-CdR-Infusion) zu erklären. Es ist anzunehmen, daß es trotz der im Ansatz II erkennbaren starken Aktivierung des salvage pathway zu einer Aufstauung von Zellen am Übergang von der G₁-Phase zur S-Phase kommt. Bei der Zugabe von inaktivem Thymidin beginnen diese Zellen gemeinsam die DNS-Synthese, wobei dann das angebotene Desoxycytidin inkorpo-

riert wird. Die sehr hohe Inkorporation von radioaktivem Material in die DNS des Ansatzes IV (92.998 cpm/mg-DNS) legt somit die Deutung einer Teilsynchronisation, der Walker-Carcinomzellen nahe.

5. AUSBLICK

Sensibilitätstestungen von Tumorexplantaten gegenüber Zytostatika, proliferationskinetische Untersuchungen und die Möglichkeit einer phasenspezifischen, zeitlich begrenzten Blockierung proliferierender Zellen innerhalb des Generationszyklus bzw. die medikamentöse Induktion einer Teilsynchronisation von Tumorzellpopulationen sind nicht nur für die experimentelle Zellforschung von Interesse, sondern insbesondere für die Therapie maligner Erkrankungen: Gelingt es Tumorgewebe von Patienten zu erhalten, so kann anstelle einer blinden Zytostatikaapplikation eine individuelle, gezielte Chemotherapie durchgeführt werden. Durch die beschriebene prätherapeutische Sensibilitätstestung der Tumorexplantate gegenüber verschiedenen phasenspezifisch wirksamen Chemotherapeutika ist es möglich, solche Substanzen

für die Tumorbehandlung auszuwählen, die mit großer Wahrscheinlichkeit die Geschwulstzellen zu schädigen vermögen. Die Doppelmarkierung von Punktionsmaterial und die Bestimmung des Markierungsindex ermöglichen die Generationszeit T , die Dauer der DNS-Synthesephase t_S und der postmitotischen Ruhephase T_1 durch eine einfache mathematische Gleichung (Formel VIII) zu bestimmen. Man kann entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit davon ausgehen, daß die unter in vitro Bedingungen ermittelten Zykluszeiten gut mit denen unter in vivo Verhältnissen korrelieren. Durch die Applikation eines prätherapeutisch ausgetesteten, phasenspezifisch wirksamen Zytostatikums über einen bestimmten Zeitraum, kann eine Teilsynchronisation der Tumorzellpopulation herbeigeführt werden; auf Grund der Kenntnis der Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen kann dann gezielt zu einem bestimmten Zeitpunkt ein zweites phasenspezifisches Medikament verabreicht und somit eine wesentlich größere Anzahl von proliferierenden Tumorzellen letal geschädigt werden, als dies bei einer asynchron wachsenden Population möglich ist.

Die kurativen Aussichten einer solchen, auf Teilsynchronisation einer Tumorzellpopulation ausgerichteten Chemotherapie sind allerdings begrenzt, da nur der proliferierende Anteil betroffen wird. Ist dieser Anteil allerdings hoch, oder treten nach und nach immer mehr Zellen aus der G_0 -Phase in den Teilungszyklus ein, so kann durch wiederholte Teilsynchronisierungen und sinnvolle, konsekutive, phasenspezifische Zytostatikaapplikation eine wirksame Tumorthherapie erzielt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde eine in vitro Methode zur Sensibilitäts-
testung von Ascites-Tumoren, soliden Geschwulsten und
Trypsin-dispergierten, soliden Tumoren gegenüber Zyto-
statika erarbeitet. Die Beeinflussung des RNS-Stoffwechsels
durch Actinomycin D und Vincristin-Sulfat wurde an
Zajdela-Hepatomen, Yoshida-Sarkomen, Walker-Carcinomen,
einem menschlichen Mamma-Carcinom und einem Wilms-Tumor
überprüft. Dabei konnte bei allen Tumoren eine starke
Beeinträchtigung des RNS-Stoffwechsels durch Actinomycin
D gefunden werden. Vincristin-Sulfat zeigte in keinem
Fall eine Beeinflussung des RNS-Stoffwechsels. Beim Ver-
gleich der Empfindlichkeit von Ascites-Tumoren, mit so-
liden Geschwulsten und Trypsin-dispergierten, soliden
Tumorformen gegenüber Actinomycin D und Vincristin konnten
keine Unterschiede festgestellt werden.

2. Die Dauer der Zellzykluszeit T und ihrer Teilphasen
(t_M , t_{G1} , t_S , t_{G2}) von soliden Walker-Carcinomen wurde auf
2 verschiedenen Wegen ermittelt:

- a) Bestimmung der Prozentkurve markierter Mitosen
in vivo und
- b) Doppelmarkierung von Tumorpunktionsmaterial mit
 ^3H - und ^{14}C -markiertem Thymidin.

Die Doppelmarkierung wurde rein in vitro, kombiniert in vivo/in vitro und rein in vivo durchgeführt. Zur Berechnung der Dauer der einzelnen Phasen des Zellzyklus wurde ein mathematisches Verfahren erarbeitet. Die hiermit errechneten Werte für die Generationszeit T und die DNS-Synthesephase t_S stimmen gut mit den aus Prozentkurve markierter Mitosen ermittelten Ergebnissen überein. Die Tatsache, daß sowohl bei reiner Doppelmarkierung in vivo, als auch bei kombinierter in vivo/in vitro Doppelmarkierung und bei reiner in vitro Doppelmarkierung gleiche Ergebnisse erhalten wurden, ermöglicht es, Zyklusphasenzeiten, die unter in vitro Bedingungen gemessen wurden, auf in vivo Verhältnisse zu übertragen.

3. Ratten mit Walker-Carcinomen wurden zunächst für 24 Stunden mit 5-Fluorouracil und anschließend für 9 Stunden

mit inaktivem Thymidin infundiert. Gleichzeitig wurde den Tumorzellen tritiiertes Desoxycytidin angeboten. Durch anschließende DNS-Extraktion, quantitativer DNS-Bestimmung und Messung des in die DNS aufgenommen radioaktiven Materials im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer, konnten Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, daß unter der Wirkung von 5-Fluorouracil eine Teilsynchronisation der Tumorzellen eingetreten war. Eine solche Partialsynchronisation einer Tumorzellpopulation stellt neben der genauen Kenntnis der proliferationskinetischen Daten eines Malignoms und der sinnvollen, phasenspezifischen Zytostatikaapplikation eine wichtige Voraussetzung für eine wirkungsvolle Zytostatikatherapie dar.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADELSTEIN, S.J., LYMAN, C.P., OBRIEN, R.C.: Variations in the incorporation of thymidine into the DNA of some rodent species.
Comp.Biochem.Physiol. 12, 223-231 (1964)
2. BASERGA, R.: The relationship of the cell cycle to tumor growth and control of cell division: a review.
Cancer Res. 25, 581-595 (1965)
3. BICKIS, I.J., HENDERSON, I.W.D.: Biochemical studies of human tumors - I. Estimation of tumor malignancy from metabolic measurements in vitro.
Cancer 19, 89-102 (1966)
4. BICKIS, I.J., HENDERSON, I.W.D., QUASTEL, J.H.: Biochemical studies of human cancers. II. In vitro estimation of individual tumor sensitivity to anticancer agents.
Cancer 19, 103-113 (1966)
5. BOSCH, L., HARBERS, E., HEIDELBERGER, Ch.: Studies on fluorinated Pyrimidines. V. Effects on nucleic acid metabolism in vitro.
Cancer Res. 18, 335-343 (1958)
6. BRAY, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.
Anal.Chem. 1, 279-285 (1950)
7. BRINKMANN, W., DÖRMER, P.: In vitro Verfahren zur Bestimmung der DNA Synthese - Dauer einzelner Zellen.
Biochemische Voraussetzungen und Ergebnisse.
Histochemie 30, 335-343 (1972)
8. BURCHENAL, J.H., HOLMBERG, E.A.P., FOX, J.J., HEMPHILL, S.C., REPERT, J.A.: The effects of 5-fluorodeoxycytidine, 5-fluorodeoxyuridine and related compounds on transplanted mouse leukemias.
Cancer Res. 19, 494-500 (1959)

9. CHAUDHURI, N.K., MONTAG, B.J., HEIDELBERGER, Ch.: Studies on fluorinated pyrimidines. III. The metabolism of 5-fluorouracil-2-C¹⁴ and 5-fluorotic-2-C¹⁴ acid in vivo.
Cancer Res. 18, 318-327 (1958)
10. CLINE, M.J.: Effect of Vincristine on synthesis of ribonucleic acid and protein leukaemia leukocytes.
Brit.J.Haematol. 14, 21-30 (1968)
11. COBB, J.P., WALKER, D.G., WRIGHT, J.C.: Comparative chemotherapy studies on primary short-term cultures of human normal, benign and malignant tumor tissues - a 5 year study.
Cancer Res. 21, 583-590 (1961)
12. CURRERI, A.R., ANSFIELD, F.G., McIVER, F.A., WAISMAN, A.A., HEIDELBERGER, Ch.: Clinical studies with 5-FU.
Cancer Res. 18, 478-484 (1958)
13. CUTTS, J.H.: The effect of vincalcoblastine on dividing cells in vivo.
Cancer Res. 21, 168-172 (1961)
14. DIPAOLO, J.A.: In vitro test systems for cancer chemotherapy. I. Inhibition of dehydrogenases and growth in the Ehrlich ascites tumor.
Cancer Res. 23, 184-190 (1963)
15. DIPAOLO, J.A.: The use of human tumor effusions in primary culture for testing chemotherapeutic compounds. A preliminary report.
Cancer 17, 391-394 (1964)
16. Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen
Basel (1968)
17. DÖRMER, P., BRINKMANN, W., DAHR, P.Jr.: Thymidylate de novo Synthese, salvage pathway und DNS-Synthese während der Differenzierung von Erythroblasten.
Blut 25, 185-189 (1972)

18. DRUCKREY, H., STEINHOFF, D., HAKAYAMA, W., PREUSSMANN, R.,
ANGER, K.: Experimentelle Beiträge zum Dosis-
Problem in der Krebs-Chemotherapie und zur
Wirkungsweise von Endoxan.
Dtsch.Med.Wschr. 88, 651-63, 715-721 (1963)
19. DULBECCO, R., VOGT, M.: Zitiert nach cells and tissues in
culture.
Edit. Willer E.N., I, 54 (1965)
20. EAGLE, H., FOLEY, G.E.: The cytotoxic activity of carcino-
lytic agents in tissue culture.
Am.J.Med. 21, 739-749 (1956)
21. EAGLE, H.: Cytotoxicity in human cell cultures as a primary
screen for the detection of antitumor agents.
Cancer Res. 18, 1017-1025 (1958)
22. EARLE, W.R., SCHILLING, E.L., BRYANT, J.C. and V.J.EVANS:
Growth of pure strain L cells in fluid suspen-
sion cultures.
J.Nat.Canc.Inst. 14, 1153-1171 (1954)
23. EHRHART, H.: Chemotherapie maligner Geschwülste.
Münch.Med.Wschr. 18, 115, 814-832 (1973)
24. EIDINOFF, M.L., RICH, M.A.: Growth inhibition of a human
tumor cell strain by 5-fluoro-2-deoxyuridine:
Time parameters for subsequent reversal by
thymidine.
Cancer Res. 19, 521-524 (1959)
25. GALAVAZI, G., SCHENK, H., BOOTSMAN, D.: Synchronization of
mammalian cells in vitro by inhibition of
the DNA synthesis. I. Optimal Conditions.
Exptl. Cell Res. 41, 428-437 (1966)
26. GALAVAZI, G., BOOTSMAN, D.: Synchronization of mammalian
cells in vitro by inhibition of DNA synthesis.
II. Population Dynamics.
Exptl. Cell Res. 41, 438-451 (1966)

27. GANZER, U., NITZE, H.R., ROSEMAN, G.: Über eine neue Behandlungsmethode fortgeschrittener Krebsgeschwülste.
Med. Welt 23, 303-305 (1972)
28. GILBERT, C.W.: The labelled mitoses curve and the estimation of the parameters of the cell cycle.
Cell Tissue Kinet. 5, 53-63 (1972)
29. GUPTA, G.N.: A simple in vial combustion method for assay of hydrogen-3, carbon-14 and sulfur-35 in biological, biochemical and organic materials.
Analytical Chemistry 38, 1356-1359 (1966)
30. HÄMMERLEIN, G.: Numerische Mathematik I
Bibliogr.Inst., Mannheim/Wien/Zürich
Hochschul Taschenbuchverlag 498/498a, 142-143 (1969)
31. HELPAP, B., MAURER, W.: H3-Thymidineinbau unter in vivo und in vitro Bedingungen an Geweben von Maus und Ratte.
Naturwissenschaften 54, 570 (1967)
32. HELPAP, B., MAURER, W.: Bemerkungen zu autoradiographischen Untersuchungsmethoden von Excisionsgeweben in vitro mit H3-Thymidin.
Ver.d.dtsch.Ges.f.Path. 51, 262-265 (1967)
33. HEMPEL, K.: Analyse des Zellzyklus der Melanocyten des Harding-Passey-Melanoms der Ratte unter besonderer Berücksichtigung der "Growth-Fraction".
Virchows Arch.Abt. B, Zellpath. 1, 15-30 (1968)
34. HILSCHER, W., MAURER, W.: Autoradiographische Bestimmung der Dauer DNS Verdopplung und ihres zeitlichen Verlaufes bei Spermatogonien der Ratte durch Doppelmarkierung mit C14- und H3-Thymidin.
Die Naturwissenschaften. 49, 352 (1962)

35. HIRSCHBERG, E.: Tissue culture in cancer chemotherapy screening.
Cancer Res. 18, 869-878 (1958)
36. HITCHINGS, G.H., ELION, G.B.: Mechanisms of action of purine and pyrimidine analogues.
Cancer Chemotherapy II.
Edit. by Brodsky, J., Kahn, S.B. and Moyer, J.H., 23-32 (1972)
37. HOLMBERG, B.: On the permeability to lissamine green and other dyes in the course of cell injury and cell death.
Experimental Cell Res. 22, 406-414 (1961)
38. JOHNSON, I.S., ARMSTRONG, J.G., GORMAN, M., BURNETT, J.P.Jr.: The vinca alkaloids - a new class of oncolytic agents.
Cancer Res. 23, 1390-1427 (1963)
39. KARNOFSKY, D.A.: Differences in cancers in terms of therapeutic responses.
Cancer Res. 16, 684-697 (1956)
40. KIM, J.H., GELBARD, A.S., PEREZ, A.C.: Action of hydroxyurea on the nucleic acid metabolism and viability of Hela cells.
Cancer Res. 27, 1301-1305 (1967).
41. KLEIN, H.O., LENNARTZ, K.J., HARTIG, M., EDER, M., GROSS, R.: Synchronisation von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und ihre Bedeutung bei der Anwendung eines alkylierenden Cytostaticums.
Klin.Wschr. 48, 1001-1005 (1970)
42. KLEIN, H.O., LENNARTZ, K.J., GROSS, R., EDER, M., FISCHER, R.: In vitro und in vivo Untersuchungen zur Zellkinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen. Ihre Bedeutung für die cytostatische Tumorthherapie.
Dtsch.med.Wschr. 37, 1237-1252 (1972)

43. KUMMER, D.: Cytostatica-Sensibilitätstest solider, maligner Tumoren in vitro zur gezielten kombinierten operativen und chemotherapeutischen Behandlung des Krebsleidens.
Z.Krebsforsch. 76, 124-139 (1971)
44. KUPIECKI, F.P.: Cell culture studies with unique cytotoxic steroids.
Cancer Res. 25, 417-420 (1965)
45. KUROKI, T., SATO, H.: Partial synchronisation of hamster embryonic cells in secondary culture.
Exp.Cell Res. 61, 210-213 (1970)
46. LALA, P.K., MALONEG, M.A., PATT, H.M.: Measurement of DNA synthesis time in myeloid-erythroid precursors.
Exptl.Cell Res. 38, 626-634 (1965)
47. LEITER, J., ABBOLT, B.J., BOURKE, A.R., FITZGERALD, D.B., SCHEPARTZ, S.A.: Screening data from the cancer chemotherapy national service center screening laboratories IX, plant extracts C 5600.
Cancer Res. 22, 219 (1962)
48. LENNARTZ, K.J., MAURER, W.P.: Autoradiographische Bestimmung der DNS Verdoppelung und der Generationszeit beim Ehrlich-Ascites-Tumor der Maus durch Doppelmarkierung mit H3- und C14-Thymidin.
Z.Zellforsch. 63, 478-485 (1964)
49. LENNARTZ, K.J., SCHÜMMELFEDER, N., MAURER, W.: Dauer der DNS-Synthesephase bei Ascitestumoren der Maus unterschiedlicher Ploidie.
Naturwissenschaften 53, 21-22 (1966)
50. LENNARTZ, K.J., MAURER, W., EDER, M.: Auswertungsverfahren bei Doppelmarkierung mit C14- und H3-Thymidin für exponentielles Wachstum.
Histochemie 13, 84-90 (1968)
51. LETTRE, H.: Krebs-Dokumentation und Statistik maligner Tumoren, Verhandlungsbericht.
Hrsg. Wagner, F.K.Schattauer-Verlag Stuttgart (1965)

52. LIMBURG, H., KRAHE, M.: Die Züchtung von menschlichem Krebsgewebe in der Gewebekultur und seine Sensibilitätstestung gegen neuere Zytostatika.
Dtsch.med.Wschr. 22, 1938-1946 (1964)
53. LORD, B.J.: Measurement of the duration of DNA synthesis in erythroid cells of the bone marrow using a double labelling autoradiographic technique designed specifically for use with haemopoietic tissues.
Cell Tiss. Kinet. 3, 13-19 (1970)
54. MARTIN, R.J., SCHLOERB, P.R.: Induction of mitotic synchrony by intermittent hyperthermia in the Walker 256 rat carcinoma.
Cancer Res. 24, 1997-2000 (1964)
55. MATTERN, J., KAUFMANN, M., VOLM, M., SCHÜTZE, U., WAYSS, K., SOEPITLER, K., TASCA, C.: Zur Sensibilitätstestung maligner menschlicher Tumoren gegenüber Cytostatika. II.
Klin.Wschr. 50, 196-198 (1972)
56. MAURO, F., MADOC-JONES, H.: Age responses of cultured mammalian cells to cytotoxic drugs.
Cancer Res. 30, 1397-1408 (1970)
57. McALLISTER, R.M., GRÜNMEIER, P.W., CORIELL, L.L., BLAKE-MORE, W.S.: A quantitative technique for the measurement of in vitro cytotoxicity of 5-fluor-2-deoxyuridine (FUDR), nitrogen mustard (NH₂), and other antitumor agents.
Cancer 12, 938-943 (1959)
58. MENDELSON, M.L.: Cell proliferation and tumor growth.
In: L.F. Lamerton and P.J.M. Fry (eds), cell proliferation,
Blackwell Scientific Publishers, Oxford:
190-210 (1963)
59. MORGAN, J.F., MORTON, H.J., PARKER, R.C.: Nutrition of animal cells in culture. Initial studies on a synthetic medium.
Proc.Soc.exp.Biol. 73, 1-8 (1950)

60. NEWTON, A.A., WILDY, D.: Parasynchronous division of hela cells.
Exptl. Cell Res. 16, 624-635 (1959)
61. NIAS, A.H.W., FOX, M.: Synchronization of mammalian cells with respect to the mitotic cycle, review article.
Cell Tissue Kinet 4, 375-398 (1971)
62. NITZE, H.R., GANZER, U., VOSTEEN, K.-H.: Die Strahlenbehandlung maligner Tumoren nach Synchronisation des Zellteilungsrythmus.
Strahlentherapie 143, 329-337 (1972)
63. PFEFFER, S.E., TOLMACH, L.J.: Inhibition of DNA synthesis in He La cells by hydroxyurea.
Cancer Res. 27, 124-129 (1967)
64. PILGRIM, Ch., MAURER, W.: Autoradiographische Bestimmung der DNS Verdoppelungszeit verschiedener Zellarten von Maus und Ratte bei Doppelmarkierung mit H3- und C14-Thymidin.
Die Naturwissenschaften 49, 544-545 (1962)
65. QUASTLER, H., SHERMAN, F.G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.
Exp.Cell Res. 17, 420-438 (1959)
66. RABES, H.: Untersuchungen zur humoralen Regulation bei regenerativem und malignem Wachstum.
Veröffentlichungen aus der morphologischen Pathologie, 73, 4-30 (1967)
67. RABES, H.: Bestimmung der Zellzyklusphasen in heterogenen Tumorzellpopulationen in vivo.
Z.Naturforsch. 24b, 468 (1969)
68. RABES, H., JANTSCH, B.: Kombination von Kurzinkubation und Langzeitkultur beim Cytostatika-Test menschlicher Tumorzellen.
Z.Krebsforsch. 74, 295-303 (1970)

69. RAJEWSKY, M.F.: Zellproliferation in malignen und benignen Geweben: H3-Thymidineinbau in vitro unter Standardbedingungen.
Biophysik 3, 65-93 (1966)
70. RAJEWSKY, M.F.: Synchronisation in vivo: kinetics of a malignant cell system following temporary inhibition of DNA synthesis with hydroxyurea.
Exp. cell Res. 60, 269-276 (1970)
71. RAJEWSKY, M.F., HÜLSEF, D.F., FABRICIUS, E.: Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxylharnstoff in normalen und malignen Zellsystemen.
Z.Krebsforsch. 76, (1971)
72. RAJEWSKY, M.F., GRÜNEISEN, A., REMMER, I.: Modification of proliferative parameters by temporary inhibition of DNA synthesis.
Intern.Symposium on Active Control of Nucleic Acid Metabolism, Reinhardtsbrunn, Studia Biophysica (1972)
73. RAD, P.N., ENGELBERG, J.: Hela cells: Effects of temperature on the life cycle.
Science 148, 1092-1094 (1965)
74. RAPPOPORT, C.: Zitiert nach cells and tissues in culture.
Edit.: Willmer E.N. I, 54 (1965)
75. RIECKERT, R.R., MÜLLER, G.C.: Studies on unbalanced growth tissue culture. I. Induction and Consequences of thymidine deficiency.
Cancer Res. 20, 1584-1591 (1960)
76. ROMSDAHL, M.M.: Synchronization of human cell lines with Colcemid.
Exptl. Cell Res. 50, 463-467 (1967)
77. SCHMÄHL, D.: Wert und Gefahr der Krebs-Chemotherapie.
Dtsch.med.Wschr. 88, 1463-1468 (1963)

78. SCHULTZE, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nukleinsäure und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm.
Handbuch der allgemeinen Pathologie II, 466-670 (1968)
79. SEDGLEY, N.N., STONE, G.E.: DNA synthesis in vinblastine synchronized tetrahymena.
Exp.Cell Res. 56, 174-177 (1969)
80. SEIDEL, H.J., WEGNER, L.A.: Zur Sensibilitätsbestimmung von Tumoren in vitro. I. Vergleichende Untersuchungen am Jensen-Sarkom in vivo und nach einstündiger Inkubation in vitro.
Z.Krebsforsch. 72, 105-118 (1969)
81. SIGEL, M.M., SCOTTI, T.M., SCHULZ, V.B., BURNSTEIN, T.: Heterologous transplantation for demonstration of the oncogenetic effect of Rous sarcoma virus.
Cancer Res. 20, 1338-1340 (1960)
82. SISKEN, J.E. MORASCA, L., KIBBY, S.: Effects of temperature on the kinetics of the mitotic cycle of mammalian cells in culture.
Exp. Cell Res. 39, 103-116 (1965)
83. SLOTNICK, K.J., DOUGHERTY, M., JAMES, D.H.: Vincristine inhibition of DNA synthesis in tetrahymena pyrifomis.
Cancer Res. 26, 673-675 (1966)
84. SMITH, C.G., LUMMIS, W.L., GRADY, J.E.: Studies on the growth of human carcinoma cells in tissue culture.
Cancer Res. 20, 212-220 (1960)
85. STEEL, G.G.: The cell cycle in tumors: An examination of data gained by the technique of labelled mitoses.
Cell Tissue Kinet. 5, 87-100 (1972)
86. STEWART, H.L., SNELL, K.C., DUNHAM, L.J., SCHLYEN, S.M.: Atlas of tumor pathology. Transplantable and transmissible tumors of animals.
Section XII - Fascicle 40 (1959)

87. STUBBLEFIELD, E., KLEVEČZ, R.: Synchronization of chinese hamster cells by reversal of colcemid inhibition.
Exp.Cell Res. 40, 660-664 (1965)
88. SÜSS, R., VOLM, M.: Rapid screening of macromolecular synthesis in single cell cultures.
Die Naturwissenschaften 55, 134 (1968)
89. TANNEBERGER, St.: Gewebeskultur und Krebschemotherapie.
Arch.Geschwulstforsch. 31, 387-400 (1968)
90. TCHAO, R., EASTY, G.C., AMBROSE, E.J., RAVEN, R.W., BLOOM, H.J.G.: Effect of chemotherapeutic agents and hormones on organ cultures of human tumors.
Europ.j.Cancer 4, 39-44 (1968)
91. TERASIMA, T., TOLMACH, L.J.: Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing population of HeLa cells.
Exp.Cell Res. 30, 344-362 (1963)
92. TERZ, J.J., CURTCHET, H.P., LAWRENCE, W.: Analysis of the cell kinetics of human solid tumors.
Cancer, 28, 1100-1110 (1971)
93. TOPLIN, J.: A tissue culture cytotoxicity test for large scale cancer chemotherapy screening.
Cancer Res. 19, 959-965 (1959)
94. TOPLIN, J.: Experiences with the tissue culture system in large-scale cancer chemotherapy screening.
Cancer Res. 21, 1042-1046 (1961)
95. TORRE de la, GONZALEZ-FERNANDEZ, A., GIMENEZ-MARTIN, G., LOPEZ-SAEZ, J.F.: The effect of thermal shock on the division cycle of meristematic cells.
Cell Tissue Kinet. 4, 569-575 (1971)
96. VEENEMA, F.J., FINGERHUT, B., GIRGIS, A.S.: Histochemistry: A possible guide to therapy of bladder tumors.
J.Urol. (Baltimore) 90, 736-746 (1963)

97. VILLADSEN-STAMPE, D., ZEUTHEN, E.: Synchronization of DNA synthesis in Tetrahymena populations by temporary limitation of access to thymine compounds.
Exp. Cell Res. 61, 302-310 (1970)
98. VINCENT, P.C., BORNER, G., CHANANA, A.D., CRONKITE, E.P., GREENBERG, M.L., JOEL, D.D., SCHIFFER, L.M., STRYCHMANS, P.A.: Studies on lymphocytes. XIV. Measurement of DNA synthesis time in bovine thoracic duct lymphocytes by analysis of labeled mitoses and by double labelling, before and after extracorporeal irradiation of the lamph.
Cell Tissue Kinet. 2, 235-247 (1969)
99. VOLM, M., SPIELHOFF, R., SÜSS, R.: Schnellbestimmung der DNS synthese mit H3-Thymidin.
Naturwissenschaften 55, 390-391 (1968)
100. VOLM, M., KAUFMANN, K., HINDERER, H., GOERTTLER, K.: Schnellmethode zur Sensibilitätstestung maligner Tumoren gegenüber Cytostatica.
Klin.Wschr. 48, 374-376 (1970)
101. WERKHEISER, W.C.: The biochemical, cellular and pharmacological action and effects of folic acid antagonists.
Cancer Res. 23, 1277-1285 (1963)
102. WHEELER, C.P.: Studies related to mechanisms of resistance to biological alkylating agents.
Ibid. 23, 1334-1349 (1963)
103. WIMBER, D.E., QUASTLER, H.: A C14- and H3-thymidine double labelling technique in the study of all proliferation in tradescantia root tips.
Exp.Cell Res. 30, 8-22 (1963)
104. WRBA, H.: Vitalitätsbestimmung durch Aufnahme und Umsatz markierter Verbindungen.
Z.Zellforsch. 53, 90-140 (1960)
105. WRBA, H., RABES, H.: Die Hemmwirkung von Serum tumortragender Tiere auf den Stoffwechsel explantierter Organe.
Ztschr.f.Krebsforsch. 64, 341-347 (1961)

106. WRBA, H., RABES, H.: Zur Methode der quantitativen Bestimmung des Umsatzes an markierten Stoffen durch Organkulturen.
Exp. Cell Res. 26, 62-69 (1962)
107. WRBA, H., RIPOLL-GOMEZ, M., RANZ, H.: Die stoffwechselsteigende Wirkung des Serums hepatektomierter Ratten auf Leberkulturen.
Exp. Cell Res. 20, 232-235 (1960)
108. WRBA, H., RABES, H., RIPOLL-GOMEZ, U., RANZ, H.: Die stoffwechselsteigernde Wirkung von Serum teilhepatektomierter Tiere auf Leberkulturen.
Exp. Cell. Res. 26, 70-97 (1962)
109. WRBA, H., RABES, H., MERKER, K.F., DOERR, P.: Zur Bedeutung des O_2 -Partialdruckes für die quantitative Bestimmung des Einbaues von radioaktiv markierten Verbindungen in Organexplantate.
Exp. Cell Res. 45, 167-177 (1966)
110. YOUNGER, J.S.: Zitiert nach cells and tissues in culture, Edit. Willmer E.N. 1, 54 (1965)
111. ZEUTHEN, E.: Independent synchronization of DNA synthesis and of cell division in same culture of tetrahymena cells. Demonstration that heat shock induced division - synchrony is by differential extension of the G 2 phase.
Exp. Cell Res. 61, 311-325 (1970)

LEBENS LAUF

Als Sohn der Eheleute Wenzel und Helene Possinger wurde ich am 5. Juni 1946 in Ingolstadt/Donau geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule wechselte ich auf das humanistische Gymnasium meiner Heimatstadt über und legte im Jahre 1966 dort die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1966/67 begann ich dann das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilian-Universität in München. Das medizinische Staatsexamen bestand ich im Sommer 1972. Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich anschließend am Pathologischen Institut, der I. Medizinischen Klinik und der Chirurgischen Klinik der Universität München ab.

